



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**SÍNTESE DE DERIVADOS DE NUCLEOSÍDEOS
VISANDO O DESENVOLVIMENTO
DE NOVOS FÁRMACOS ANTI-CHAGÁSICOS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO SUBMETIDO A UNIVERSIDADE FEDERAL
DE SANTA CATARINA PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE BACHAREL EM QUÍMICA

ACADÊMICA: LIDIANE MEIER

ORIENTADOR: Prof. Dr. MARCUS M. SÁ

Florianópolis – SC, Junho de 2004.

LIDIANE MEIER

Trabalho de Conclusão de Curso de Química Bacharelado, executado durante o semestre de 2004.1. Apresentado pela disciplina QMC 5510 – Estágio Supervisionado na Universidade Federal de Santa – UFSC, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Química.

Coordenador de Estágio: Prof^a. Dra. Iolanda da Cruz Viera

Orientador do Estágio: Prof. Dr. Marcus M. Sá

Florianópolis / SC
Semestre 2004.1.

MENSAGEM

“Ninguém escapa das derrotas.

*Por isso, é melhor perder alguns combates na luta por seus sonhos que
ser derrotado sem sequer saber porque você está lutando.”*

(Paulo Coelho)

“ Quando renunciamos a nossos sonhos,

encontramos a paz e temos um breve período de tranqüilidade.

*Mas os sonhos mortos começam a apodrecer-se dentro de nós e a infectar
todo ambiente em que vivemos.*

O que pretendíamos evitar no combate

– a decepção e a derrota –

convertem-se no único legado de nossa covardia.”

(Paulo Coelho)

AGRADECIMENTOS

- Não poderia deixar de agradecer as pessoas que me deram a oportunidade de estar aqui, meu pais. Agradecer todo o apoio, carinho, amor e dedicação que tiveram comigo. Pai, o tempo é incapaz de apagar sua imagem; a vida, incapaz de substituí-lo. Obrigada!
- Ao Prof. Marcus Sá, pela oportunidade, paciência e apoio.
- Aos colegas de laboratório, Luciano, Gustavo, Tula, Luca, Luiz, Sandro, Luciano.
- Aos meu irmãos, que sempre me apoiaram nas decisões.
- Aos meus amigos Augustinho, Luciano S, Daniela, Jaqueline, Grasielle.
- A meu namorado Izoldir, pela paciência e dedicação.
- A Universidade Federal de Santa Catarina, junto com o departamento de Química, que proporcionaram a conclusão deste curso e o conhecimento por mim adquirido.
- E por fim, àquele que muitas vezes foi esquecido, mas continuou me guiando para o caminho certo – DEUS.

SUMÁRIO

ÍNDICE ANALÍTICO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Caracterização do problema.....	1
1.2 Planejamento racional de fármacos.....	2
1.3 Seleção de moléculas como possíveis inibidores da enzima alvo GAPDH..	6
1.4 Outras aplicações dos análogos de nucleosídeos.....	8
2 JUSTIFICATIVA.....	10
3 OBJETIVOS.....	10
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	12
4.1 Preparação dos derivados de inosina 2	12
4.1.1 Acilação das hidroxilas do anel ribosídico do nucleosídeo.....	12
4.1.1.1 Preparação de 2',3',5'- <i>O</i> -tri-(4-clorobenzoil)inosina 3	13
4.1.1.2 Preparação de 2',3',5'- <i>O</i> -triacetilinosina 4	14
4.1.2 Substituição do grupamento OH por SH na posição 6- do anel purina – Preparação de 2',3',5'- <i>O</i> -triacetiltioinosina 6	15
4.1.3 Preparação da tioinosina 1	17
4.1.3.1 Solvólise utilizando trietilamina.....	17
4.2 Preparação de derivados de guanosina 7	19
4.2.1 Preparação de 2',3',5'- <i>O</i> -triacetilguanosina 8	19
4.2.2 Preparação de 2',3',5'- <i>O</i> -triacetil- <i>N</i> ² -benzoilguanosina 9	20
4.2.3 Preparação de <i>N</i> ² -benzoilguanosina 10	21
4.3 Preparação de tionucleosídeos <i>S</i> ⁶ -benzilados 12 , 13 e 14	22
4.3.1 Preparação de <i>S</i> ⁶ -benziltioinosina 12	22
4.3.2 Preparação de <i>S</i> ⁶ -benziltiguanosina 13	23
4.3.3 Preparação de <i>S</i> ⁶ -(2-hidroxi-5-nitrobenzil)tioguanosina 14	23

5 PARTE EXPERIMENTAL.....	25
5.1 Reagentes e instrumentação.....	25
5.2 Procedimento para as reações.....	25
5.2.1 Preparação dos derivados de inosina 2	25
5.2.1.1 Preparação de 2',3',5'- <i>O</i> -tri-(4-clorobenzoil)inosina 3	25
5.2.1.2 Preparação de 2',3',5'- <i>O</i> -triacetilinosina 4	26
5.2.1.3 Preparação de 2',3',5'- <i>O</i> -triacetiltioinosina 6	27
5.2.1.4 Preparação da tioinosina 1	27
5.2.2 Preparação de derivados de guanosina 7	28
5.2.2.1 Preparação de 2',3',5'- <i>O</i> -triacetilguanosina 8	28
5.2.2.2 Preparação de 2',3',5'- <i>O</i> -triacetil- <i>N</i> ² -benzoilguanosina 9	28
5.2.2.3 Preparação de <i>N</i> ² -benzoilguanosina 10	29
5.2.3 Preparação de tionucleosídeos <i>S</i> ⁶ -benzilados 12 , 13 e 14	29
5.2.3.1 Preparação de <i>S</i> ⁶ -benziltioinosina 12	30
5.2.3.2 Preparação de <i>S</i> ⁶ -benziltioguanosina 13	30
5.2.3.3 Preparação de <i>S</i> ⁶ -(2-hidroxi-5-nitrobenzil)tioguanosina 14 ..	31
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	32
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
ANEXOS.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Vista lateral do barbeiro.....	1
Figura 1 - Fosforilação oxidativa do D-gliceraldeído-3-fosfato (GAP) para 1,3-difosfoglicerato (DPG) a partir de fosfato inorgânico e catálise de GAPDH.....	3
Figura 3 - (a) Adenosina ligando-se às cavidades da gGAPDH de <i>T. brucei</i> (b) Adenosina ligando-se às cavidades na GAPDH humana (c) 2'-desoxi-2'-(3-metoxibenzamido)adenosina.....	4
Figura 4 - Representação espacial da adenosina ligando-se às cavidades da gGAPDH de <i>T. brucei</i>	4
Figura 5 - Representação 3D da estrutura da enzima gGAPDH de <i>T. cruzi</i>	6
Figura 6 - Derivados de nucleosídeos sintetizados como inibidores da gGAPDH de <i>T. cruzi</i>	7
Figura 7 - Agentes quimioterapêuticos derivados de purinas.....	8
Figura 8 - Tionucleosídeos como agentes tumorais.....	9
Figura 9 - Derivados de nucleosídeos propostos para síntese.....	12

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Acilação da inosina 2.....	13
Esquema 2 – Cloração de álcoois e geração do intermediário clorado 5....	15
Esquema 3 - Preparação do intermediário clorado 5.....	16
Esquema 4 - Síntese do derivado triacetilado 6.....	16
Esquema 5 - Solvólise do derivado triacetilado 6.....	17
Esquema 6 - Síntese de 2',3',5'-O-triacetilguanosina 8.....	19
Esquema 7 - Síntese de 2',3',5'-O-triacetil- <i>N</i> ² -benzoilguanosina 9.....	20
Esquema 8 - Síntese de <i>N</i> ² -benzoilguanosina 10.....	21
Esquema 9 - Síntese de tionucleosídeos <i>S</i> ⁶ -benzilados 12, 13 e 14.....	22
Esquema 10 - Rota proposta para a preparação de tioinosina 1.....	32
Esquema 11 - Rota proposta para a síntese de <i>N</i> ² -benzoilguanosina 10.....	33

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Inibição seletiva de GAPDH de parasitas por derivados de 2'-desoxi-2'-(3-metoxibenzamido)adenosina (IC_{50} em $\mu\text{mol L}^{-1}$).....	5
Tabela 2 - Reações de solvólise e as respectivas condições reacionais.....	18

SIGLAS E ABREVIATURAS

AcOH – Ácido acético;

AcOEt – Acetato de etila;

ATP – Adenosina trifosfato;

DMF – *N,N*-dimetilformamida;

EtOH – Etanol;

GAPDH – Gliceraldeido-3-fosfatodesidrogenase;

gGAPDH – Gliceraldeido-3-fosfatodesidrogenase glicossomal;

IC₅₀ – Concentração necessária para atingir 50% de inibição enzimática;

IV – Espectroscopia Infra Vermelho;

MeOH – Metanol;

NAD – Nicotinamida adenina dinucleotídeo;

P.f. – Ponto de fusão;

Py – Piridina;

Rend. – Rendimento;

t.a. – Temperatura ambiente;

TEA – Trietilamina;

Ph – Fenil.

RESUMO

A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e representa um grave problema de saúde. A enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase glicossomal (gGAPDH) de *T. cruzi* é uma proteína essencial ao parasita. Estudos realizados revelaram que nucleosídeos contendo grupos aromáticos na sua estrutura apresentam atividade inibitória elevada frente à enzima gGAPDH.

O presente trabalho envolve a síntese de análogos de nucleosídeos e posterior avaliação inibitória frente à enzima gGAPDH de *T. cruzi*. Os alvos sintéticos são derivados de tioinosina e tioguanosina contendo grupos aromáticos em sua estrutura, empregando metodologias simples e baratas, incluindo modificações de grupos funcionais e química dos grupos protetores.

A preparação dos derivados de inosina foi efetuada a partir de reações de acilação nas posições 2', 3' e 5' do anel ribosídeo, usando como principal agente acilante anidrido acético em presença de piridina, fornecendo a triacetilinosina com rendimento de 75%. Subseqüentemente, este derivado triacetilado foi tratado com $\text{SOCl}_2/\text{DMF}/\text{CHCl}_3$ gerando um intermediário clorado, que na presença de tiouréia em refluxo de metanol produziu a triacetiltioinosina em duas etapas (rend. 50%). A clivagem dos grupos protetores com $\text{Et}_3\text{N}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ forneceu a tioinosina (rend. 95%), que servirá como precursor sintético para uma série de derivados de tióis.

Assim, na etapa seguinte, a tioinosina foi tratada com cloreto de benzila em NaOH, formando o derivado S-benzilado. O mesmo método foi empregado para a S⁶-benzilação da tioguanosina, fornecendo os respectivos S-alquilnucleosídeos, em rendimentos moderados (aprox. 50%). Os derivados estão em processo de caracterização.

Os candidatos a inibidores sintetizados neste trabalho estão sendo avaliados nos testes de inibição enzimática, visando correlacionar a atividade inibitória observada com a estrutura molecular do inibidor, pretendendo-se obter um grupo de inibidores potentes e aptos para desenvolvimentos subseqüentes até tornarem-se candidatos a testes clínicos.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Caracterização do problema

Apesar dos vários avanços da medicina moderna, a doença de Chagas ainda se apresenta como um problema de saúde extremamente importante nos dias de hoje. Segundo a Organização Mundial de Saúde, existem entre 16 e 18 milhões de pessoas no mundo que encontram-se infectadas pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*,^{1,2} causador da doença de Chagas, ocorrendo anualmente cerca de 21000 mortes relacionadas com a infecção.³ Esta é uma endemia que possui várias relações com o Brasil: foi descoberta em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas, estende-se basicamente do México até o sul da Argentina e atinge principalmente populações negligenciadas economicamente.⁴ O *T. cruzi* pertence à família *trypanosomatidae*, que inclui desde protozoários que não provocam doenças nos animais vertebrados, até formas altamente patogênicas.²

Há dois estágios da doença em humanos: o estágio agudo, que aparece logo após a infecção e o estágio crônico, que pode levar alguns anos até apresentar os sintomas. As lesões causadas na fase crônica são irreversíveis e afetam freqüentemente órgãos como o coração, esôfago, cólon e o sistema nervoso periférico.⁵

Cabe ressaltar que a transmissão natural do *T. cruzi* a humanos está associada, em grande extensão, com a picada de um inseto-vetor conhecido popularmente como *barbeiro*^{1,2} ou *chupão*⁶ (Figura 1). Este inseto deposita excremento contendo formas infecciosas de tripomastigotas metacíclicos, que então contaminam a ferida formada a partir da sua picada.²



Figura 2- Vista lateral do barbeiro fazendo uma refeição sanguínea e excretando.

Apesar do considerável trabalho experimental desenvolvido, ainda não existe um tratamento terapêutico eficiente para a doença, já que as drogas mais utilizadas – Lampit (nifurtimox) e Rochagan (benzonidazol) – possuem eficácia duvidosa e encontram-se sob intensa avaliação, além de apresentarem vários efeitos colaterais pronunciados.¹⁻⁶ Por todos estes motivos, é necessário que sejam feitas pesquisas envolvendo o desenvolvimento de novos fármacos no combate à doença de Chagas.

1.2 Planejamento racional de fármacos

O desenvolvimento de novos fármacos caracteriza-se por sua complexidade, fruto da multiplicidade de fatores que envolvem o planejamento molecular de novas estruturas capazes de apresentar os efeitos farmacológicos desejados, os quais, além da biodisponibilidade adequada ao seu emprego terapêutico, seguro e confortável, incluem ainda a toxicidade e o metabolismo.

Em função desta variedade de fatores, necessita-se de uma complexa tríade para o desenvolvimento racional de novos fármacos, a qual inclui: Química Orgânica – Farmacologia – Química Computacional.⁷ Além disso, o planejamento racional de fármacos ainda emprega tecnologia de ponta na área de Química Medicinal, como cristalografia de raio-X de proteínas, biologia molecular, química combinatória, modelagem molecular e ensaios biológicos de alta eficiência. É um processo que se baseia na inibição ou estimulação da atividade biológica de macromoléculas (proteínas e ácidos nucleicos), responsáveis por várias doenças.

O processo de planejamento racional de fármacos baseado em estruturas tridimensionais de proteínas tem sido utilizado mundialmente por vários grupos de pesquisa e também por companhias farmacêuticas, na busca por substâncias ativas biologicamente.⁸ Essa nova metodologia permite o acesso mais rápido e mais eficiente a compostos que são potencialmente aptos ao desenvolvimento, até tornarem-se drogas mais efetivas e seguras.

Em 1977, Oppenheimer e Borst descobriram que na corrente sanguínea dos parasitas da família *Trypanosomatidae* existe uma organela, o glicossoma, que é responsável pela glicólise (metabolismo da glicose). Estes parasitas não possuem um ciclo de Krebs funcional,⁹ sendo portanto extremamente dependentes da glicólise para a produção de ATP. Esta observação sugere que as enzimas glicolíticas sejam alvos atrativos para o desenho de drogas tripanocidas.

A enzima gliceraldeído-3-fostato desidrogenase glicossomal (gGAPDH) de *T. cruzi* é responsável pela catálise da fosforilação oxidativa do D-gliceraldeído-3-fostato (GAP) para 1,3-difosfoglicerato (DPG) (Figura 2). Esta enzima é um homotetrâmero de massa molecular aproximadamente 156 kDa, formada por quatro sub-unidades, cada qual apresentando duas funções: a função NAD⁺ ou N-terminal e a função catalítica ou C-terminal.⁹

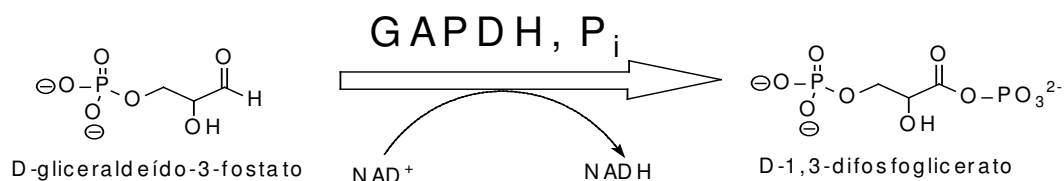


Figura 3 - Fosforilação oxidativa do D-gliceraldeído-3-fostato (GAP) para 1,3-difosfoglicerato (DPG) a partir de fosfato inorgânico e da catálise com GAPDH.

Verlinde *et al.*^{3,4,10-15} vêm sintetizando moléculas como inibidores da enzima gGAPDH de *T. brucei* e *L. mexicana*, em busca de novos fármacos para a doença do sono. Eles elucidaram a estrutura cristalina de gGAPDH de *T. brucei*, e compararam à estrutura tridimensional da enzima homóloga humana. Apesar da alta similaridade estrutural na região do sítio ativo, a cavidade da adenosina para o cofator NAD⁺ apresentou diferenças, abrindo perspectivas para a seleção de inibidores seletivos. A principal diferença é a presença de uma cavidade hidrofóbica de cerca de 9 Å de largura, próxima a hidroxila O2' do fragmento adenosina para a gGAPDH de *T. brucei* (Figura 3a) ausente na enzima humana devido à ocupação dessa região por um resíduo de isoleucina 37 (Figura 3b). Através da exploração desse estudo, foram criados análogos de adenosina que ocupariam esta cavidade e manteriam a ligação hidrogênio com o carboxilato da asparagina (Asp 37), além de atuarem em interações hidrofóbicas. O derivado 2'-desoxi-2'-(3-metoxibenzamido)adenosina (Figura 3c) apresentou inibição frente a gGAPDH de *T. brucei* 45 vezes maior que a adenosina e não apresentou evidência de bloqueio na GAPDH humana. Assim, análogos de adenosina podem se tornar fortes candidatos a inibidores seletivos de GAPDH.^{3,15}

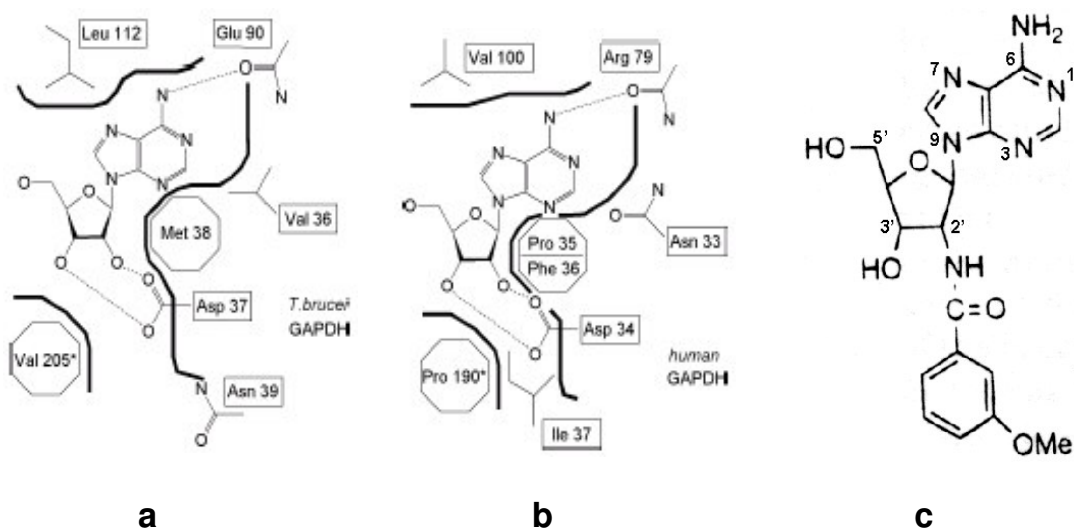


Figura 3 – (a) Adenosina ligando-se às cavidades da gGAPDH de *T. brucei* (b) Adenosina ligando-se às cavidades na GAPDH humana (c) 2'-Desoxi-2'-(3-metoxibenzamido)adenosina.

Após a síntese de várias moléculas na tentativa de um aumento da inibição, Verlinde *et al* concluíram que derivados da adenosina que contêm um grupo substituinte em N^6 formam estruturas que favorecem a afinidade, aprimorando o *design* para novas moléculas. O átomo em N^6 é adjacente a duas áreas hidrofóbicas na superfície da proteína, uma formada pelos sítios ligados a leucina, (Leu 112), fenilalanina (Phe 113) e arginina (Arg 91), outra por metionina (Met 38) e arginina (Arg 91) (Figura 4).³

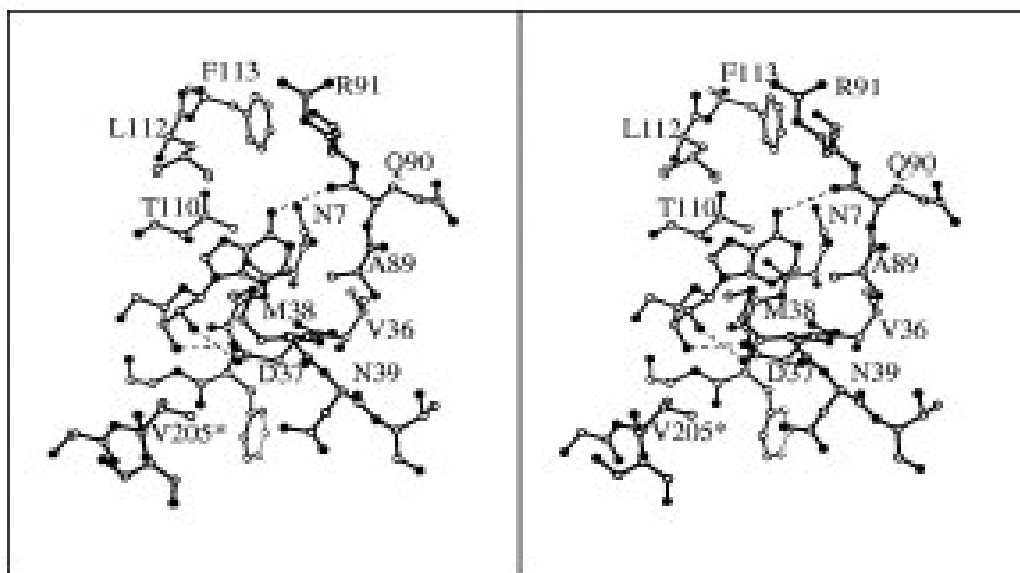


Figura 4 – Representação espacial da adenosina ligando-se às cavidades da gGAPDH de *T. brucei*.

A partir destes dados, foram sintetizados e testados vários análogos da adenosina e os que apresentaram resultados de inibição mais expressivos estão expostos na Tabela 1,³ confirmando a seletividade proposta.

Tabela 1: Inibição seletiva de GAPDH de parasitas por derivados de 2'-desoxi-2'-(3-metoxibenzamido)adenosina (IC₅₀ em $\mu\text{mol L}^{-1}$).

N ⁶ -substituinte	<i>L. Mexicana</i>	<i>T. brucei</i>	<i>T. cruzi</i>	Humano
Benzil	16	159	160	>530 ^a
2-metilbenzil	4	40	35	>270 ^a
1-naftalenometil	0,2	2	5	>200 ^a

^a insolúvel acima desta concentração

Devido a grande proximidade entre as estruturas das enzimas gGAPDH de *T. cruzi* e *T. brucei* (90% semelhantes), Oliva *et al* propuseram que a gGAPDH de *T. cruzi* (Figura 5) poderia ser utilizada para a busca computacional de inibidores específicos para a doença de Chagas.^{9,16}

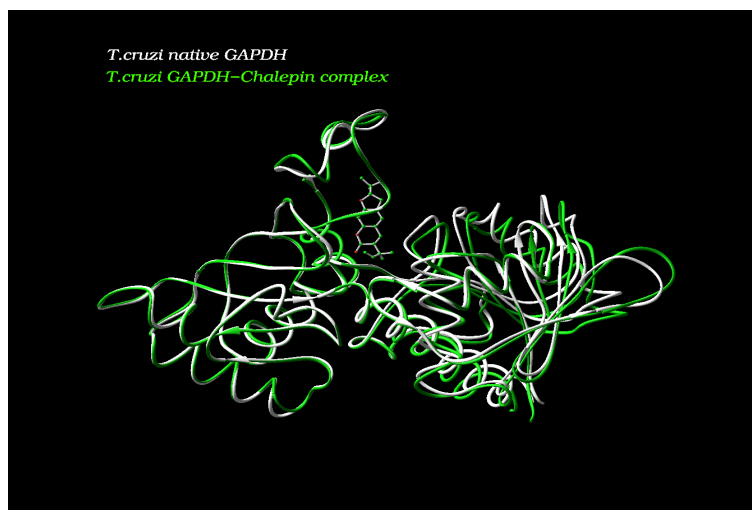


Figura 5 - Representação 3D da estrutura da enzima gGAPDH de *T. cruzi*.

No sítio ligante do cofator NAD⁺ (ou N-terminal) das enzimas GAPDH estudadas, duas regiões são consideradas atrativas para o desenho de inibidores específicos. Uma região que merece destaque é onde estão presentes os resíduos leucina e glicina, próximos a N⁶ no anel purínico, região que se conserva tanto para as gGAPDH de *T. cruzi* como de *T. brucei* e que resulta em diferenças de polaridade e volume, quando comparados com o correspondente resíduo na enzima humana, sendo um bom sítio para o desenho de inibidores específicos.

A outra região do sítio ligante do cofator NAD^+ , também considerada interessante para o estudo computacional de novos protótipos inibidores de gGAPDH, é a interface formada por duas unidades vizinhas na parte ativa do tetrâmero, que também está próxima ao sítio de ligação da porção adenosina do cofator NAD^+ . Nesta região, uma cavidade hidrofóbica de 10 Å de largura é formada na enzima tripanossomial, porém, é ausente na enzima humana, graças a uma diferença na principal porção de aminoácidos causada pela presença do aminoácido prolina.⁹ Os resíduos que participam deste sítio na gGAPDH de *T. cruzi* são metionina, valina e ácido aspártico, enquanto na homóloga humana são encontrados fenilalanina, prolina e principalmente isoleucina, a qual representa mudanças estruturais bastante significativas na comparação das enzimas, por atuar como um bloqueador na cavidade da enzima humana.

Estes resultados foram similares aos encontrados na comparação entre gGAPDH de *T. brucei* e a GAPDH humana, levando a crer que derivados homólogos de adenosina poderiam fornecer interessantes resultados de inibição e seletividade de GAPDH de *T. cruzi*.¹⁷

Portanto, compostos que preencham o sítio de ligação NAD^+ , e ainda apresentem substituintes volumosos capazes de explorar a cavidade hidrofóbica adjacente na enzima do parasita (possibilitando interações favoráveis com gGAPDH de *T. cruzi*, mas reduzida afinidade com GAPDH humana), podem fornecer resultados promissores quanto à seletividade na inibição.

1.3 Seleção de moléculas como possíveis inibidores da enzima alvo GAPDH

Como foi comentado na seção 1.2, existem diferenças significantes entre as enzimas GAPDH humana e tripanossomial. Estas diferenças estão de acordo com a observação de que a afinidade do NAD^+ pela gGAPDH de *T. cruzi* é 5-10 vezes menor do que pela respectiva enzima encontrada nos seres humanos.⁹ Este fato foi de suma importância para o objetivo de sintetizar moléculas baseadas no desenho de inibidores seletivos da enzima gGAPDH.

A partir de estudos feitos pelo método de busca computacional utilizando o programa DOCK 3.5,^{16,17} foi observado que compostos que se destacaram como candidatos a inibidores de gGAPDH de *T. cruzi* foram os derivados dos

nucleosídeos inosina e guanosina (Figura 6). Os compostos são comercialmente disponíveis e foram empregados na preparação de um grupo representativo de nucleosídeos. Os derivados sintéticos¹⁸ foram posteriormente submetidos aos

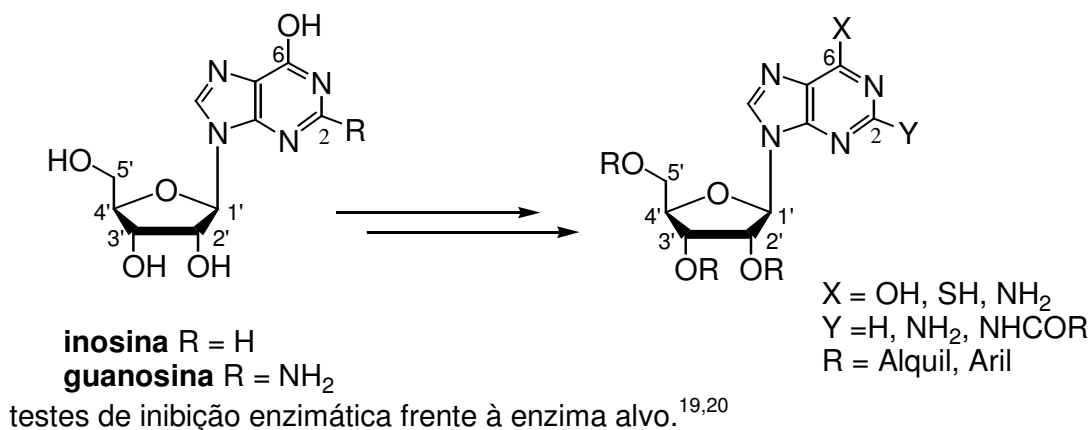


Figura 6 - Derivados de nucleosídeos sintetizados como inibidores da gGAPDH de *T. cruzi*.

Os resultados apresentados por estes nucleosídeos mostraram porcentagens de inibição de gGAPDH significativas. Alguns destes derivados como os triacilinosina (X = OH; Y = H; R = 4-ClPhCO, 3,5-(NO₂)₂PhCO) exibem resultados de 30-50% de inibição em concentração na faixa de 150-200 μM, indicando que os nucleosídeos contendo grupos aromáticos nas posições 2'- e 3'- do anel tetraidrofurano apresentam-se como bons protótipos de inibidores. Já o derivado tribenzoiltioinosina (X = SH; Y = H; R = PhCO) aumentou a atividade inibitória sensivelmente, destacando-se como o mais ativo (IC₅₀ = 82 μM). Entretanto, o derivado triacetiltioinosina (X = SH; Y = H; R = CH₃CO) não apresentou atividade inibitória, sugerindo que apenas a presença do grupo tiol no anel purina não é suficiente para a atividade observada para tribenzoiltioinosina. De fato, nucleosídeos que não possuem grupos aril nas posições 2'- e 3'- também não apresentaram inibição frente à gGAPDH.

Em suma, a presença de grupos aril nos derivados de nucleosídeos parece ser necessária para que a atividade inibitória seja observada, sugerindo que estes grupos aromáticos devem possuir uma maior complementaridade estereoeletrônica com o sítio ativo da enzima.¹⁶⁻¹⁸ Além disso, constata-se que a presença de um grupo tiol (-SH) na posição 6- do anel purínico, como na tribenzoiltioinosina, aumenta sensivelmente a atividade inibitória.

1.4 Outras aplicações dos análogos de nucleosídeos

Análogos de Nucleosídeos, conhecidos também como Nucleosídeos Inibidores da Transcriptase Reversa, atuam como substratos alternativos ou “falsos blocos de construção”, competindo com os nucleosídeos fisiológicos, diferindo deles numa simples alteração da porção carboidrato. Eles são amplamente usados na medicina, sendo importantes componentes de quase todas as combinações terapêuticas e potentes inibidores de replicação viral e bacteriana.²¹

No início da década de 50, Gertrude Elion e George Hitchings descobriram que a 6-mercaptopurina tinha propriedades antitumorais e antileucêmicas. Esta descoberta levou ao desenvolvimento de outros derivados purínicos e de compostos relacionados, incluindo os nucleosídeos de importância medicinal considerável.^{22a}

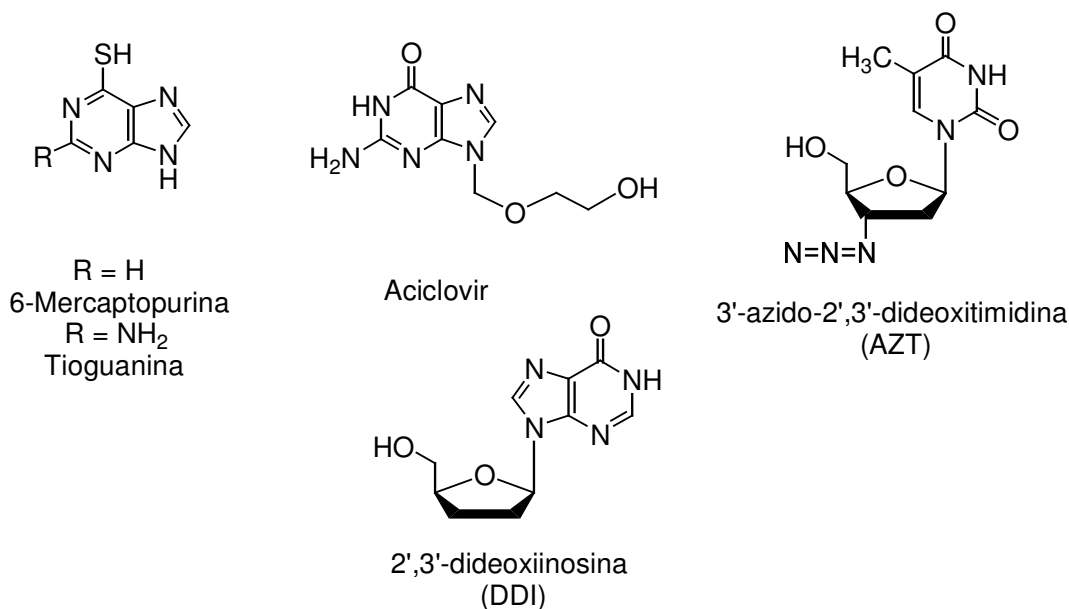


Figura 7 – Agentes quimioterapêuticos derivados de purinas.

A 6-mercaptopurina é usada, em combinações com outros agentes quimioterapêuticos, no tratamento da leucemia aguda em crianças, sendo que hoje quase 80% dos pacientes tratados são curados. O aciclovir é altamente eficiente no tratamento de doenças causadas por certos vírus da herpes. O AZT,

análogo da timidina, e o DDI, análogo da inosina, são anti-retrovirais usados no tratamento contra a AIDS (Figura 7).²¹⁻²³

Apesar da sua importância clínica, 6-mercaptopurina e 6-tioguanina têm algumas desvantagens terapêuticas, o que estimulou a síntese de novos derivados de purina com eficácia terapêutica. Assim, a introdução de grupos sulfenoamido, sulfinioamido ou sulfonoamido na posição 6 do anel purínico de alguns nucleosídeos resultou em compostos solúveis em água e com significativa atividade antitumoral (figura 8).²⁴

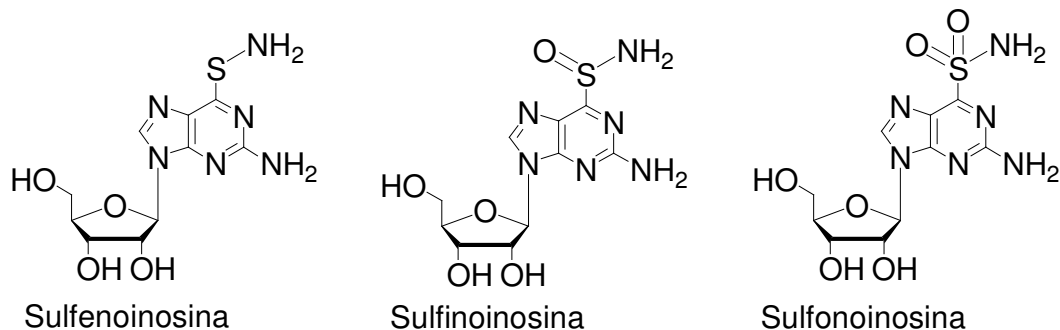


Figura 8 – Tionucleosídeos como agentes tumorais.

A substituição na posição 2 do anel de adenina por um átomo de halogênio gera um nucleosídeo biologicamente ativo, 2-cloroadenosina, que causa uma depleção seletiva somente de células naturais. Outro agente terapêutico obtido foi o 2-cloro-2'-deoxiadenosina (NSC 105014-F, cladribina), que é clinicamente usado no tratamento de leucemia. A influência da introdução de substituintes alquil na posição 2 das bases purínicas também foi testada, mas nenhuma atividade citostática foi notada entre estas combinações; só a atividade anti-hipertensiva de 2-octiniladenosina foi observada.²⁵

2 JUSTIFICATIVA

A doença de Chagas representa um grave problema de saúde pública para o Brasil, sendo responsável por dezenas de milhares de óbitos por ano, apenas em nosso país. Este fato demonstra claramente a importância de se atacar o problema com propostas diferentes e abordagens modernas e efetivas para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Como descrito por Verlinde *et al*,^{3,4,10-15} derivados da adenosina que contêm um grupo substituinte em N6 ou que são seletivamente benzoilados possuem uma elevada afinidade frente à GAPDH, aprimorando o *design* para novas moléculas inibidoras. Entretanto, para o desenvolvimento destes derivados são necessárias várias etapas e métodos de preparação de alto custo. Devido à semelhança estrutural entre as enzimas gGAPDH de *T. cruzi* e *T. brucei*, Oliva *et al* propuseram que a gGAPDH de *T. cruzi* poderia ser utilizada para a busca computacional de inibidores específicos para a doença de Chagas.⁹ Desta forma, grupos de compostos foram selecionados pelo método de busca computacional utilizando o programa DOCK 3.5, que apontou derivados de inosina como candidatos a inibidores de gGAPDH de *T. cruzi*. Os resultados preliminares do nosso grupo revelaram que nucleosídeos contendo grupos aromáticos e a função tiol apresentaram um aumento na atividade inibitória.

3 OBJETIVOS

O objetivo central deste trabalho envolve a síntese de inibidores seletivos da enzima gGAPDH de *T. cruzi*, planejados a partir dos resultados observados nos testes de inibição enzimática e nos experimentos utilizando *docking* (seção 1.3). Com isso, pretende-se sintetizar derivados da inosina contendo grupamentos aromáticos nas posições 2'-, 3'- e 5'- do anel ribosídeo e análogos contendo um grupo tiol na posição 6- do anel purínico. Será abordado também a síntese de derivados S⁶-benzilados de tioinosina e tioguanosina e N²-benzoilados de guanosina, todos serão sintetizados a partir de reagentes comercialmente disponíveis, através de proposições de rotas sintéticas simples e métodos descritos na literatura (Figura 9).

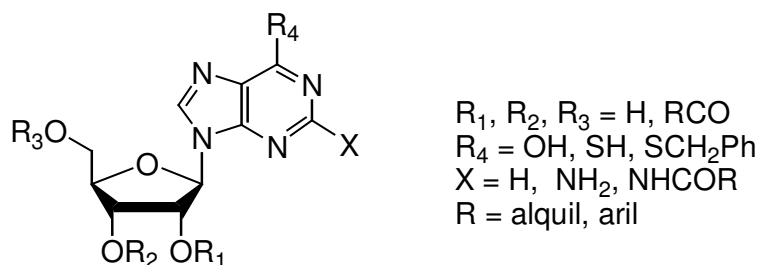


Figura 9 – Derivados de nucleosídeos propostos para síntese.

Todos os candidatos a inibidores sintetizados neste trabalho serão avaliados nos testes de inibição enzimática, visando correlacionar a atividade inibitória observada com a estrutura molecular do inibidor.

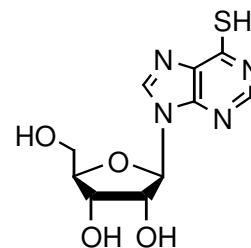
Em suma, os objetivos deste trabalho consistem em:

1. Sintetizar análogos de nucleosídeos derivados de inosina, guanosina, 6-tioinosina e 6-tioguanosina;
2. Caracterizar os compostos sintetizados através de métodos físicos e técnicas espectroscópicas;
3. Submeter os análogos sintéticos aos testes de inibição de GAPDH;
4. Planejar a síntese da nova geração de inibidores a partir de Modelagem Molecular.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PREPARAÇÃO DOS DERIVADOS DE INOSINA (2)

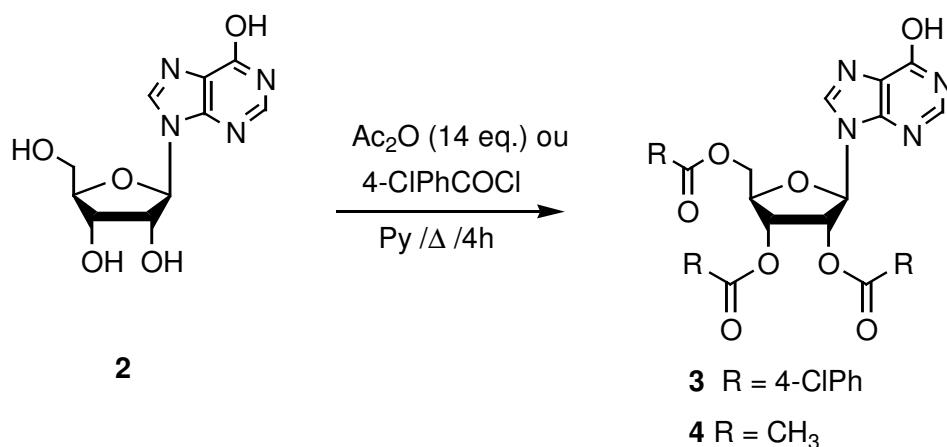
A tioinosina (1) é a precursora de uma série de derivados, contudo é pouco acessível comercialmente e sua preparação a partir da inosina comercial (2) é economicamente mais viável. Dessa forma, foi desenvolvida uma metodologia simples para a síntese de tioinosina (1) a partir da inosina (2) em três etapas. Na primeira é efetuada a proteção dos grupos hidroxila, pois para que se possa



efetuar a conversão 6-OH \rightarrow 6-SH é necessário que os grupos hidroxila do anel ribosídeo sejam protegidos, caso contrário, estes grupamentos também serão atacados, não permitindo que modificações com diferentes substituintes na porção ribosídeo do nucleosídeo possam ser feitas. Assim, a segunda etapa consiste na conversão do grupo OH por SH na posição 6- do anel purínico, seguida da clivagem dos grupos protetores fornecendo a tioinosina (1).

4.1.1 Acilação das hidroxilas do anel ribosídeo do nucleosídeo

Reagir o ribonucleosídeo com anidrido de ácido ou cloreto de ácido, em piridina (Esquema 1)²⁶⁻²⁹ é um bom método para se preparar análogos de 2',3',5'-triacilnucleosídeos. Deve-se tomar os devidos cuidados para evitar a presença de água no meio reacional, utilizando-se solventes anidros (piridina, anidrido acético), tubos secantes de cloreto de cálcio e atmosfera de N₂. Reações usando reagentes não anidros acarretaram produtos com rendimentos baixos, demonstrando a necessidade de utilizar condições anidras.



Esquema 1 – Acilação da inosina 2.

4.1.1.1 Preparação de 2',3',5'-O-tri-(4-clorobenzoil)inosina 3

Os ésteres podem ser sintetizados a partir da reação de cloretos de acila com álcoois. A piridina usada na reação tem função de solvente e catalisador, além de impedir a presença de HCl livre.

Na tentativa de acilação das hidroxilas para se efetuar a proteção das posições 2'-, 3'- e 5'- do anel ribosídeo da inosina **2** (Esquema 1), estudou-se a metodologia aplicada por Fox *et al.*,²⁸ porém substituindo o cloreto de benzoíla por cloreto de 4-clorobenzoíla como agente acilante.

O tempo de reação foi de 3 h a 67 °C e aproximadamente 1 h a 43 °C. Sólidos, inicialmente esbranquiçados, estavam presentes durante todo tempo da reação, aderidos às paredes do balão, indicando que o reagente de partida não foi completamente solubilizado no meio reacional. Após a remoção do aquecimento, a mistura reacional permaneceu sob agitação a temperatura ambiente por mais 12 horas, onde parte do sólido ainda ficou insolúvel.

A mistura reacional foi dissolvida com CH₂Cl₂ e à fase orgânica foi adicionada uma solução aquosa de NaHCO₃ 10% e H₂O com a função de extrair o ácido 4-clorobenzoíco formado como subproduto da reação e hidrolisar qualquer cloreto de ácido remanescente. Em seguida o solvente foi evaporado e o sólido pastoso resultante foi recristalizado com acetona/hexano fornecendo duas frações, a primeira, um sólido levemente amarelado correspondente ao anidrido 4-clorobenzoíco, o que foi comprovado através de ponto de fusão, 193-194 °C (P.f.³⁰ = 194 °C), e de bandas de absorção em 1787 e 1722 cm⁻¹, características do estiramento C=O de anidridos de ácidos. Na segunda fração, obteve-se um

sólido amarelo com 60% de rendimento. O desaparecimento da banda em 1787 cm^{-1} e a presença de bandas em 1730 e 1704 cm^{-1} , características dos estiramentos C=O de ésteres e C=O do anel purínico, respectivamente, no espectro de IV do sólido são um grande indício de que o produto desejado, 2',3',5'-O-tri-(4-clorobenzoil)inosina (**3**), foi obtido.

Assim, além de ser um candidato a apresentar atividade inibitória frente à enzima GAPDH, o composto **3** também pode ser sintetizado com a função de proteção dos grupos hidroxila do anel da ribose, contudo não é o método mais viável para este fim, por gerar subprodutos (anidrido 4-clorobenzóico) de difícil separação e rendimentos moderados para o derivado triacilado **3**.

4.1.1.2 Preparação da 2',3',5'-O-triacetilinosina **4**

Com o objetivo de melhorar o rendimento da reação e gerar subprodutos de fácil separação, a proteção das posições 2', 3' e 5' do anel ribosídico do nucleosídeo **2** foi efetuada utilizando-se anidrido acético como agente acilante.

O tempo de reação foi de 4 h a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o reagente de partida apresentou boa solubilidade no meio reacional. Após o término da reação, durante o resfriamento à temperatura ambiente, pode-se observar a precipitação de cloridrato de piridínio abaixo de $70\text{ }^{\circ}\text{C}$, onde ocorre a diminuição da sua solubilidade.

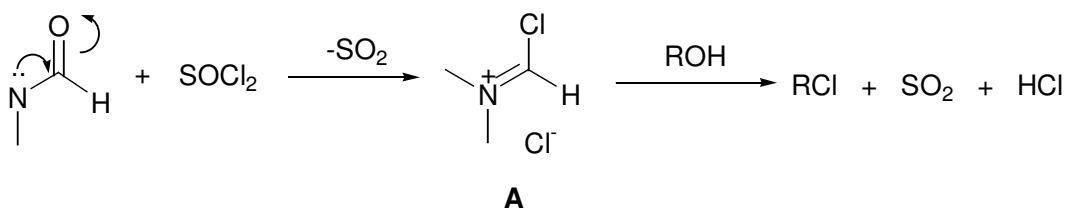
O produto resultante da acetilação, após recristalização com CH_2Cl_2 /hexano, foi um sólido amorfo branco com rendimento de 75% (Rend. lit.²⁹ = 90%) e facilmente caracterizado por meio de ponto de fusão e Infra Vermelho. O ponto de fusão obtido para o produto resultante foi de $242\text{-}244\text{ }^{\circ}\text{C}$, podendo-se dizer que está dentro do esperado, comparando-se com os pontos de fusão da literatura que apresentam valores de $241\text{ }^{\circ}\text{C}$ ²⁹ e $236\text{-}238\text{ }^{\circ}\text{C}$.³¹ O aparecimento das bandas de absorção em 1760 e 1735 cm^{-1} , características de estiramento C=O de éster e o desaparecimento das bandas em 3432 e 3296 cm^{-1} referentes aos grupos OH da inosina, no espectro de Infra Vermelho obtido para o produto de reação, são um forte indício da formação do produto esperado, 2',3',5'-O-triacetilinosina (**4**). A obtenção do espectro de RMN- ^1H não foi necessário pela possível caracterização do produto a partir do P.f. e Infra Vermelho, através de comparações com outras amostras do mesmo composto já obtidas anteriormente pelo grupo de trabalho.^{18,32}

O uso de anidrido acético como agente acilante é o método que se destacou para a proteção da inosina, por envolver reagentes baratos e de fácil acesso, além de gerar subprodutos (ácido acético) de separação simples e apresentar um rendimento alto.

4.1.2 Substituição do grupamento OH por SH na posição 6- do anel purina – Preparação de 2',3',5'-O-triacetiltioinosina 6

Com os grupos hidroxila do anel ribosídeo protegidos, é possível fazer a conversão do grupo 6-OH para 6-SH do anel purínico da inosina. Esta foi feita utilizando-se o procedimento descrito por Ikehara *et al*,³³ onde o processo de tionação é feito em duas etapas.

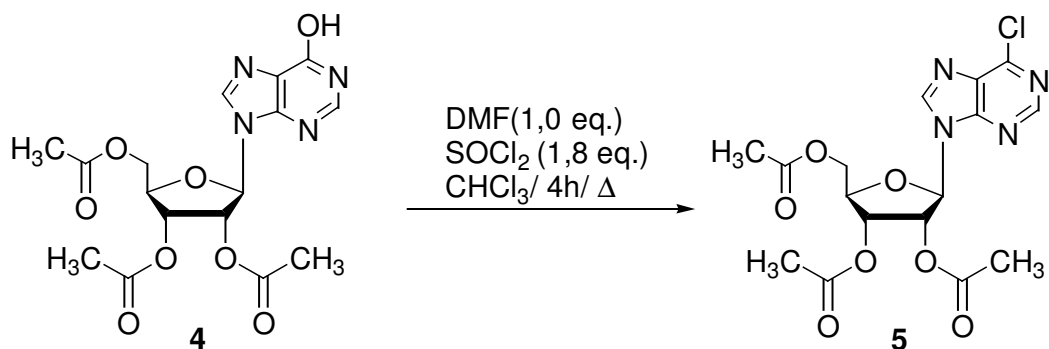
A primeira etapa da síntese consiste em promover uma substituição nucleofílica aromática do grupo OH por cloro, proveniente do intermediário clorado **A**, gerado a partir da reação entre DMF e cloreto de tionila conforme Esquema 2. Foram empregados solventes e reagentes devidamente secos (anidros), tubos secantes de cloreto de cálcio e atmosfera de N₂, deixando-se o substrato (**4**) reagir com SOCl₂/DMF em clorofórmio por 4 horas a 70-75 °C, conforme descrito na literatura.³³ Os compostos apresentaram boa solubilidade nos solventes utilizados, facilitando o procedimento da reação.



Esquema 2 – Cloração de álcoois e geração do intermediário clorado 5.

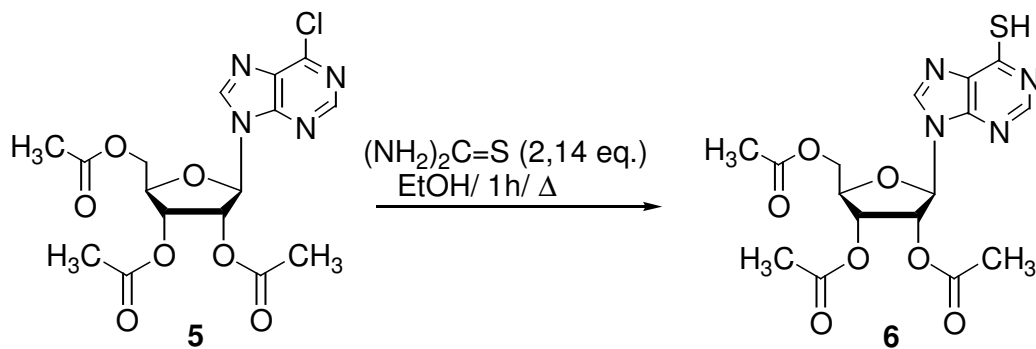
O óleo amarelo resultante, possivelmente o derivado 6-clorotriacetilinosina **5** (Esquema 3),³³ é o precursor da etapa de tionação, onde a introdução do grupo tiol é efetuada por tiouréia.

Tentativas de isolamento do derivado 6-cloroinosina **5** não apresentaram resultados satisfatórios, dessa forma o material não foi caracterizado, sendo imediatamente utilizado na etapa seguinte.



Esquema 3 – Preparação do intermediário clorado 5.

Na segunda etapa da reação (Esquema 4), o óleo foi solubilizado em EtOH e a esta solução adicionou-se tiouréia. Nos primeiros dez minutos da reação já pode ser observada a formação de produto através do aparecimento de um precipitado claro, o que indica que a reação é rápida e o produto esperado não apresenta boa solubilidade no meio. Após 1:10 h a 95 °C, o precipitado foi filtrado, lavado com água e MeOH e caracterizado por ponto de fusão e Infra Vermelho. O P.f. de 248-249 °C (P.f.³¹ 252-253 °C) e o desaparecimento da banda em 1706 cm⁻¹, característica do estiramento C=O do anel purínico, no espectro de Infra Vermelho do produto de reação, indicam que ocorreu a conversão de OH → SH.

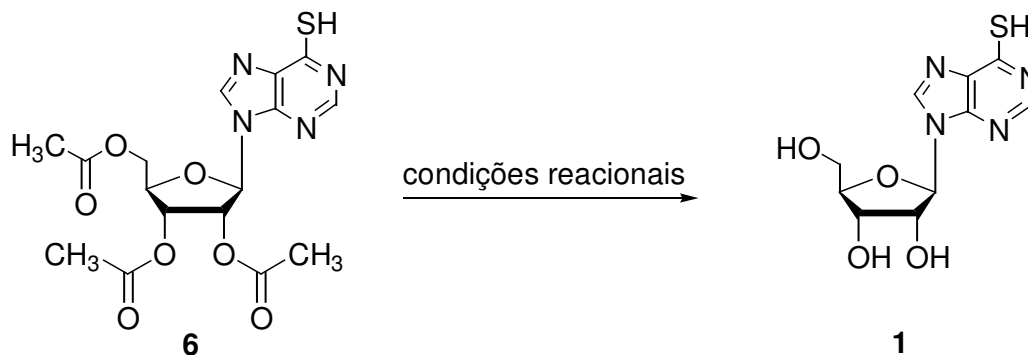


Esquema 4– Síntese do derivado triacetilado 6.

Nas reações em que se usou reagentes não anidros, o composto **6** foi obtido com rendimentos baixos (30-35%) e conversão incompleta, fato verificado pelo espectro de Infra Vermelho, pela presença das bandas de absorção em 1700 cm⁻¹, característica do estiramento C=O do anel purínico da inosina de partida, o que não é verificado nas reações sob condições anidras. Dessa forma, a triacetiltioinosina (**6**) foi obtida com rendimento de 50%, após otimização da reação realizada com mudanças nas condições reacionais.

4.1.3 Preparação da tioinosina 1

Na alcoólise de ésteres, um álcool é capaz de deslocar o grupo alcóxido do éster através de transesterificação. No entanto, para deslocar o equilíbrio para a direita torna-se necessário usar o álcool responsável pela alcoólise em grande excesso relativamente à quantidade de éster. Esta transesterificação poder ser tanto catalisada por ácidos como por bases, possuindo mecanismos semelhantes.³⁴



Esquema 5 – Solvólise do derivado triacetilado **6**.

Os álcalis também promovem hidrólise dos ésteres por fornecerem um reagente fortemente nucleofílico, o HO^- . A reação é irreversível, pois o íon carboxilato, estabilizado por ressonância, denota pouca tendência a reagir com álcoois.^{22b}

4.1.3.1 Solvólise utilizando trietilamina

Em trabalhos anteriores³² foram realizadas reações de solvólise empregando vários métodos, geralmente em meio básico usando-se $\text{NaHCO}_3/\text{MeOH}$,²⁶ NaOH/EtOH ,²⁶ NH_3/MeOH ,³¹ $\text{TEA}/\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$.^{35,36} Dentre as reações de solvólise estudadas, aquelas que apresentaram melhores resultados foram NH_3/MeOH e $\text{TEA}/\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$, sendo que a última foi mais efetiva por apresentar maior rendimento (45%) e por gerar menos dificuldades no preparo da reação, sendo a mais indicada para a desacilação da triaciltioinosina (**6**). Com o objetivo de estudar esta etapa, foram realizadas reações de solvólise empregando várias condições reacionais, usando-se $\text{TEA}/\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ e o composto **6** como substrato da reação. As reações de solvólise estudadas estão resumidas no Esquema 5 e na Tabela 2.

Tabela 2 – Reação de solvólise e as respectivas condições reacionais.^a

Reação	Condições reacionais		Rendimento (%)
	Et ₃ N (eq.)	Tempo (h)	
1	14,6	24	95
2	14,6	6	97
3	7,3	24	98
4	7,3	6	96

^a 2',3',5'-*O*-triacetiltioinosina (**6**): 1 mmol; MeOH/H₂O (2,5:1): 10:4 mL.

O objetivo da solvólise utilizando TEA é promover a reação de clivagem dos grupos acetil, obtendo-se subprodutos voláteis, como o éster correspondente ao álcool utilizado, acetato de metila, além da TEA que está no meio reacional, por isso de fácil tratamento. Para proceder a reação, foi preparada uma solução com Et₃N/MeOH/H₂O, conforme Tabela 2, e sobre esta foi adicionado o substrato, 2',3',5'-*O*-triacetiltioinosina (**6**), que rapidamente solubilizou no meio reacional. O acompanhamento da reação foi feito por cromatografia de camada delgada usando uma solução de AcOEt/MeOH 1:1 como eluente. A reação ficou sob agitação magnética à t.a., em seguida foi evaporada no rotaevaporador. O sólido foi recristalizado em MeOH. O ponto de fusão obtido para o sólido, 213-215 °C, está de acordo com os valores da literatura relatados para a tioinosina (**1**) (P.f.³¹ = 208-210 °C, P.f.³⁷ = 221-223 °C). O espectro de Infra Vermelho apresenta o aparecimento de uma banda de absorção em 3377 cm⁻¹, característica de estiramentos OH e o desaparecimento da banda correspondente ao éster inicial em 1748 cm⁻¹, indicando que o composto foi desacetilado, confirmando o sucesso da reação.

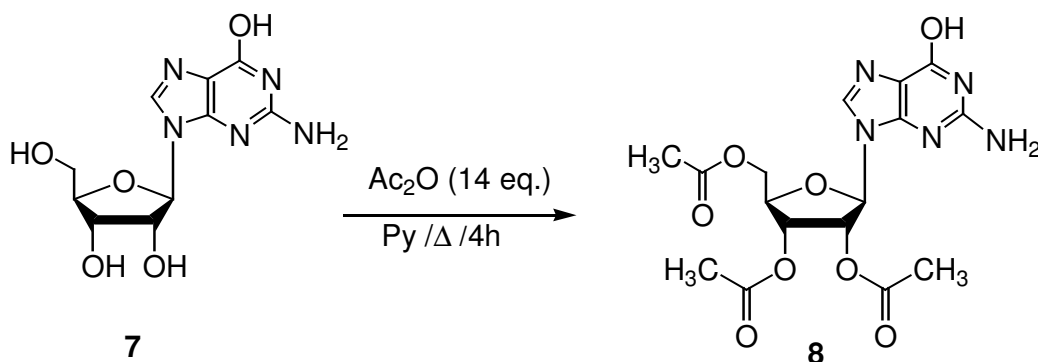
O comportamento da reação foi o mesmo em todas as condições reacionais e os produtos foram obtidos em rendimentos excelentes (95-98%) e apresentaram características físicas (P.f. e espectro de IV) semelhantes. Este fato comprova que a reação pode ser realizada com sucesso em qualquer uma das condições relatadas na Tabela 2.

4.2 PREPARAÇÃO DE DERIVADOS DE GUANOSINA 7

O sucesso na desproteção dos grupos protetores dos derivados triacilados de tioinosina estimulou o emprego de TEA/H₂O/MeOH para a síntese compostos de interesse como a *N*⁶-benzoilguanosina (**10**).

4.2.1 Preparação de 2',3',5'-*O*-triacetilguanosina **8**

Para a acetilação da guanosina **7** empregou-se o mesmo procedimento usado para a acetilação da inosina **2**, diferindo apenas no tratamento da reação.



Esquema 6 – Síntese de 2',3',5'-*O*-triacetilguanosina **8**.

A adição do anidrido acético e piridina a guanosina **7** formou uma solução amarela que permaneceu até o final do refluxo. Após 48 h na geladeira, ocorreu a formação de um precipitado amarelado, que foi filtrado a vácuo e lavado com água (com prévio teste de solubilidade – insolúvel), contudo após alguns minutos o sólido começou a dissolver-se resultando em um gel, que foi dissolvido em CH₂Cl₂ e levado ao rotaevaporador, resultando em um óleo levemente amarelado.

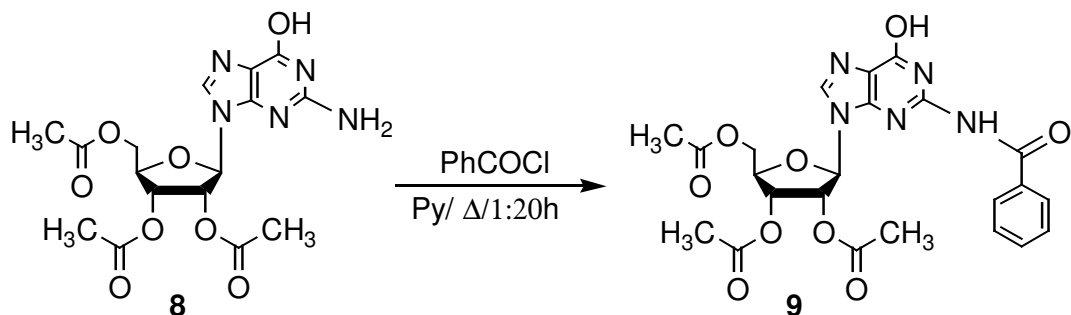
A cristalização do óleo com CH₂Cl₂/EtOH forneceu um sólido amarelado com ponto de fusão 63 °C e rendimento de 62%. O aparecimento das bandas de absorção em 1745 cm⁻¹, características do estiramento C=O de ésteres e o desaparecimento das bandas características do estiramento O–H dos grupos hidroxila do anel ribosídeo da guanosina, no espectro de Infra Vermelho obtido para o material, indicam que ocorreu a acetilação dos grupos OH do anel ribosídeo, no entanto, o ponto de fusão para o produto (P. f. = 63 °C) muito abaixo ao da literatura (P. f.²⁹ = 232 °C) indica a presença de impurezas ou mistura de

produtos contendo 2',3',5'-*O*-triacetilguanossina (**8**) e 2',3',5'-*O*, *N*²-tetraacetilguanossina devido ao excesso de reagente utilizado.

4.2.2 Preparação de 2',3',5'-*O*-triacetil-*N*²-benzoilguanossina **9**

Com os grupos hidroxila do anel ribosídeo protegidos, é possível fazer a *N*²-benzilação da guanossina **7**.

Aminas primárias e secundárias reagem com cloretos de ácido, com formação de amidas substituídas, pela substituição do -Cl por um grupo -NHR ou -NR₂ (Esquema 7).



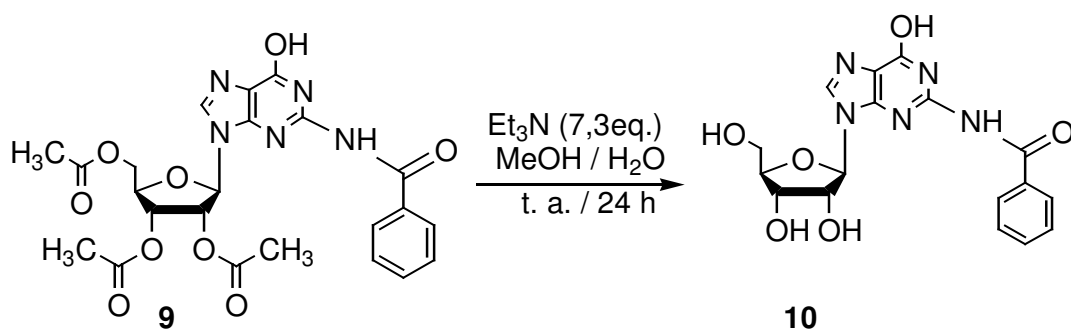
Esquema 7 – Síntese de 2',3',5'-*O*-triacetil-*N*²-benzoilguanossina **9**.

O composto 2',3',5'-*O*-triacetilguanossina **8** foi completamente solubilizado após adição do cloreto de benzoil, com formação de uma solução amarela que se tornou mais viscosa no decorrer da reação. Após, a mistura reacional foi dissolvida em CH₂Cl₂ e tratada com soluções aquosas ácida e básica para neutralizar bases e ácidos presentes na reação. A evaporação do solvente resultou em óleo amarelo. Tentativas de cristalização não forneceram resultados satisfatórios, o óleo foi então purificado por coluna cromatográfica empacotada com sílica gel e como eluente foi usada uma solução de CH₂Cl₂/hexano 10:1, seguido de CH₂Cl₂ e finalmente uma mistura de CH₂Cl₂/MeOH 20:1, obtendo-se um sólido laranja. O ponto de fusão para o produto de reação (124-125 °C) está de acordo com o ponto de fusão obtido (120-123 °C) anteriormente pelo grupo de trabalho. Já a literatura descreve o composto 2',3',5'-*O*-triacetil-*N*²-benzoilguanossina (**9**) como um sólido amorfo,^{38,39} sem especificar o P.f. A presença da banda em 1748 cm⁻¹, característica do estiramento C=O do éster e a banda intensa em torno de 1700 cm⁻¹ característico do estiramento C=O do anel purínico e de amida, no espectro de Infra Vermelho para o produto de reação, é

mais um indício da formação do produto desejado, 2',3',5'-*O*-triacetil-*N*²-benzoilguanosina **9**, obtido com 56% de rendimento.

4.2.3 Preparação da *N*²-benzoilguanosina **10**

A desproteção dos grupos acetil em **9** e obtenção da *N*²-benzoilguanosina (**10**) foi efetuada com Et₃N/MeOH/H₂O, de acordo com o procedimento usado para a clivagem da 2',3',5'-*O*-triacetilguanosina (**5**) (seção 4.1.3.1). A 2',3',5'-*O*-triacetil-*N*²-benzoilguanosina (**9**) apresentou boa solubilidade no meio reacional, facilitando o procedimento da reação (Esquema 8).



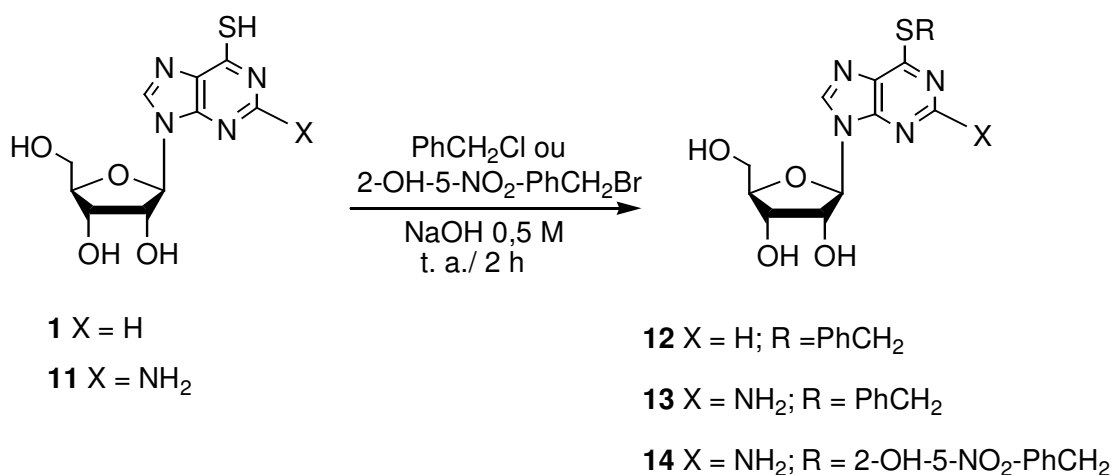
Esquema 8 – Síntese de *N*²-benzoilguanosina **10**.

O produto obtido após evaporação dos materiais voláteis foi caracterizado por Infra Vermelho, o desaparecimento da banda em 1748 cm⁻¹ confirma que ocorreu a clivagem dos grupos acetil, e a banda intensa presente em 1695 cm⁻¹, correspondente aos estiramentos C=O do anel purínico e de amida, indicando a formação da *N*²-benzoilação da guanosina **7**. Contudo, o intervalo no ponto de fusão para o sólido (214-221 °C) e a comparação com o valor fornecido pela literatura (P. f.⁴⁰ =240-241 °C) sugere a presença de impurezas, podendo corresponder à mistura do produto desejado **10** e o produto da clivagem da amida e ainda subprodutos formados, como o benzoato de metila proveniente da clivagem da amida, e que é de difícil separação. Além disso, bandas características de NH₂, provenientes da clivagem parcial da amida, podem estar encobertas pela banda larga do estiramento OH.

Desta forma, a etapa de preparação da *N*²-benzoilação da guanosina **7** está em processo de purificação e análise.

4.3 PREPARAÇÃO DE TIONUCLEOSÍDEOS S⁶-BENZILADOS 12, 13 E 14

A tioinosina (**1**), preparada anteriormente e a tioguanosina (**11**), disponível comercialmente, foram utilizadas como precursores na preparação de derivados S⁶-alquilados, tentando, desta forma, atingir parte do objetivo deste trabalho que é a preparação de derivados contendo grupamentos aromáticos e o grupo tiol em sua estrutura.



Esquema 9 – Síntese de tionucleosídeos S⁶-benzilados 12, 13 e 14.

A mistura de um tiol e NaOH gera um tiolato que reage com haletos de alquil fornecendo sulfetos por ataque nucleofílico.

Derivados 6-(RCH₂S) de **1** e **11** podem ser preparados reagindo a tioinosina **1** ou tioguanosina **11** com haletos fenilalquílicos, como descrito na literatura⁴¹⁻⁴³, são descritos diferentes métodos de preparação, como K₂CO₃/DMF, NaOH/H₂O. Pela disponibilidade e simplicidade dos reagentes empregados, utilizou-se NaOH/H₂O.

4.3.1 Preparação de S⁶-benziltioinosina 12

A adição do cloreto de benzil na solução de tioinosina **1** e NaOH 0,5 M formou uma segunda fase, que desapareceu após aproximadamente 5 min. com o aparecimento de um precipitado amarelo. A mistura reacional foi filtrada a vácuo e lavada com água. Em seguida tentou-se uma recristalização com acetona,

porém não se obteve sucesso. O produto apresentou P.f. 82-84 °C, abaixo dos valores da literatura para o composto **12** (P.f.⁴⁴ = 156-158 °C). No espectro de IV para o produto observa-se um deslocamento da banda de 1601 cm⁻¹ (para tioguanosina **1**) para 1575 cm⁻¹, indicando uma mudança estrutural, contudo, não é possível afirmar a obtenção do produto desejado **12**.

4.3.2 Preparação de S⁶-benziltioguanosina **13**

Ocorreu turvação da solução após aproximadamente 1 h, seguida da precipitação de um sólido branco que foi filtrado a vácuo e lavado com água. Depois de lavado, foi recristalizado com acetona/hexano. A caracterização do produto foi feita por ponto de fusão (P.f. para o produto: 101-103 °C), o que está de acordo com um dos valores da literatura para o S⁶-benziltioguanosina **13** (P.f.⁴² = 101-103 °C), mas discrepante em relação ao outro (P.f.⁴³ = 80-85 °C). O espectro de IV para o produto mostra um deslocamento das bandas em 1636 e 1612 cm⁻¹ (para tioguanosina **11**) para 1594 e 1563 cm⁻¹, indicando que ocorreu uma mudança na estrutura da tioguanosina de partida, contudo, não é possível confirmar a obtenção do produto desejado **13** com os dados disponíveis até o momento.

4.3.3 Preparação de S⁶-(2-hidroxi-5-nitrobenzil)tioguanosina **14**

A tioguanosina **11** foi completamente solubilizada na solução de NaOH, mas a adição do brometo de 2-hidroxi-5-nitrobenzil formou uma suspensão amarela intensa, que permaneceu até o final da agitação. A mistura reacional foi filtrada a vácuo, no entanto, não sobrou sólido no papel filtro, assim foram feitas extrações do filtrado com acetato de etila. A evaporação do solvente resultou num sólido amarelo, provavelmente contaminado com brometo de 2-hidroxi-5-nitrobenzil, pois a coloração é característica deste. A tentativa de recristalização com acetona/hexano não foi satisfatória, pois não houve variação no ponto de fusão e no espectro de Infra Vermelho. O deslocamento da banda em 1636 cm⁻¹ (presente no espectro da tioguanosina de partida) para 1594 cm⁻¹ (no espectro do produto) indica que ocorreu uma mudança estrutural no anel purínico da tioguanosina **11**, e o aparecimento das bandas em 1520 e 1340 cm⁻¹, características do grupo NO₂, sugere que há presença de compostos contendo

grupo NO₂. Sendo que o intervalo no P.f. encontrado para o produto (P. f. = 129-157 ° C) é discrepante do P.f. reportado para o composto **14** (P.f. ⁴⁵ = 184 °C), pode-se concluir que o produto esperado, se foi formado, encontra-se contaminado com impurezas, possivelmente derivados do brometo de alquil utilizado.

5 PARTE EXPERIMENTAL

5.1 REAGENTES E INSTRUMENTAÇÃO

A determinação do ponto de fusão das substâncias sólidas foi realizada em um aparelho Microquímica MQAPF301, sem sofrerem correção.

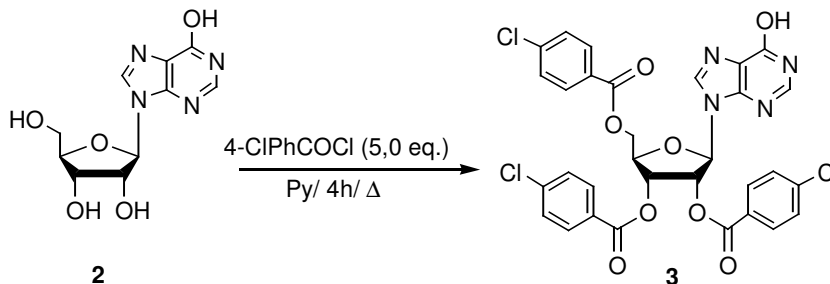
Os espectros de Infra Vermelho foram obtidos em pastilha de KBr ou filme, em espectrofotômetro Perkin-Elmer FT-IR 1600 com sistema de registro computadorizado, na região de 4000 a 400 cm^{-1} .

Todos os solventes e reagentes empregados nas sínteses e caracterizações foram adquiridos de fontes comerciais (Aldrich, Merck, Fluka, Mallinckrodt, Nuclear, Synth, J.T. Baker) e utilizados sem purificação prévia, com exceção dos cloretos de ácido (cloreto de benzoíla e cloreto de 4-clorobenzoíla) e de piridina, que foram tratados de acordo com procedimentos descritos na literatura.⁴⁶

5.2 PROCEDIMENTO PARA AS REAÇÕES

5.2.1 PREPARAÇÃO DE DERIVADOS DE INOSINA 2

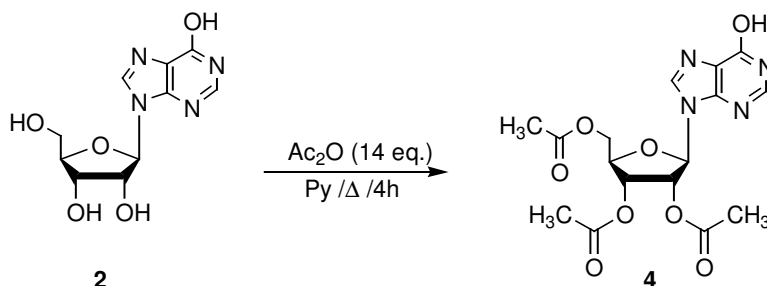
5.2.1.1 Preparação da 2',3',5'-O-tri-(4-clorobenzoil)inosina 3



Em um balão, protegido por um tubo secante de cloreto de cálcio, foram colocados 0,500 g (1,86 mmol) de inosina **2** e 5,00 mL (50,4 mmol) de piridina, a suspensão branca ficou sob agitação a 55 °C por 10 minutos e em seguida adicionou-se 1,18 mL (9,32 mmol) de cloreto de *p*-clorobenzoíla. A mistura reacional ficou sob agitação a 67 °C por 3 h e a 43 °C por aproximadamente 1 h. Removeu-se o aquecimento e a mistura continuou sob agitação a temperatura

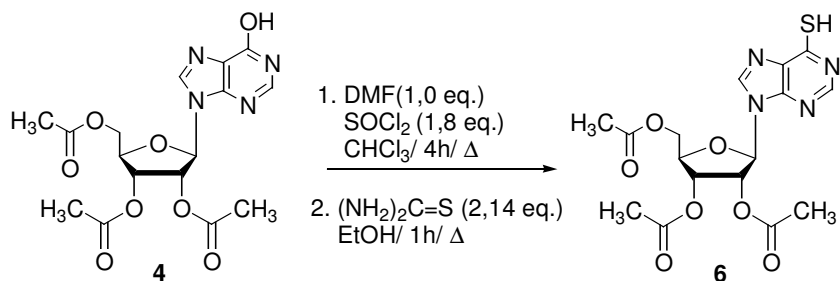
ambiente por 12 h. A reação foi dissolvida em CH₂Cl₂, lavada com H₂O, tratada com NaHCO₃ 10% e seca com Na₂SO₄. O solvente foi evaporado no rotaevaporador e o sólido resultante coevaporado três vezes com EtOH. O produto obtido, sólido pastoso alaranjado, foi recristalizado com acetona/hexano, obtendo-se duas frações: a primeira, anidrido 4-clorobenzóico, com ponto de fusão 193-194 °C (P.f.³⁰ = 194,3°C). IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}$: 1787 e 1722 cm⁻¹ (C=O anidridos de ácidos). A segunda fração forneceu 0,35 g de um sólido amarelo correspondente a 2',3',5'-O-tri-(4-clorobenzoil)inosina **3**. Rend. 59%. P.f. = 124-130 °C (P.f.¹⁸ = 147-149 °C). IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 1730 (C=O éster), 1704 (C-O anel purínico), 1593 (C=N), 1268 e 1091 (C-O ésteres aromáticos).

5.2.1.2 Preparação da 2',3',5'-O-triacetilinosina **4**



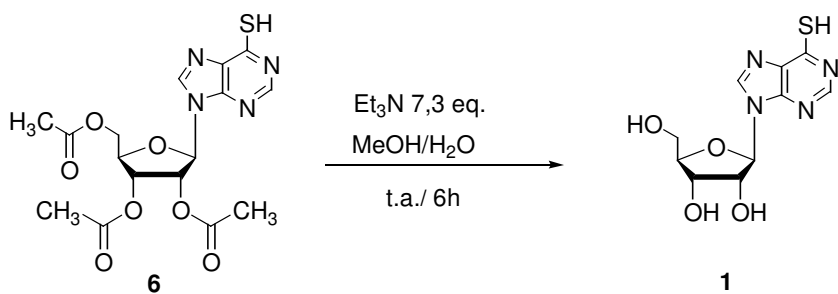
A uma solução formada por 2,00 g (7,45 mmol) de inosina **2** e 10 mL (105 mmol) de anidrido acético, protegida por um tubo secante de CaCl₂, foram adicionados 5,0 mL de piridina anidra. A mistura reacional foi deixada sob agitação magnética a 90 °C por 4 horas. Após esfriar, a reação foi diluída em água e extraída com CH₂Cl₂, a fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e o solvente evaporado em rotaevaporador. O sólido branco resultante foi coevaporado duas vezes com etanol e recristalizado com CH₂Cl₂/hexano, fornecendo 2,20 g do composto 2',3',5'-O-triacetilinosina **4** como sólido amorfo branco. Rend. 75%. P.f. = 242-244 °C (P.f.²⁹ = 241 °C, P.f.³¹ = 236-238 °C). IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 1760 e 1735 (C=O éster), 1706 (CON), 1238 (OCO).

5.2.1.3 Preparação da 2',3',5'-O-triacetiltioinosina **6**



Foram adicionados a um balão 43 mL de CHCl₃ seguidos de 0,80 mL (10,8 mmol) de SOCl₂ e 0,50 mL (6,00 mmol) de DMF. Esta solução ficou sob agitação a temperatura ambiente e atmosfera de N₂ por 12 minutos, então adicionou-se 2,36 g (6,00 mmol) de 2',3',5'-O-triacetilinosina **4** e a reação foi levada a refluxo brando por 4 h. O solvente orgânico foi evaporado em rotaevaporador e o resíduo coevaporado por duas vezes com etanol. O resíduo oleoso resultante foi solubilizado em 35 mL de EtOH, foram adicionados 0,973 g (12,8 mmol) de tiouréia e a solução foi levada a 95 °C por 1:10 h. Após atingir a temperatura ambiente, o sólido precipitado foi filtrado e lavado com H₂O e MeOH, resultando em 0,16 g do composto 2',3',5'-O-triacetiltioinosina **6** como sólido branco. Rend. 50%. P.f. = 248-249 °C (P.f.²⁷ = 252-253 °C). IV (KBr, ν_{máx}, cm⁻¹): 2732 (SH), 1748 (C=O éster), 1598 (C=N), 1246 (OCO).

5.2.1.4 Preparação da tioinosina **1**

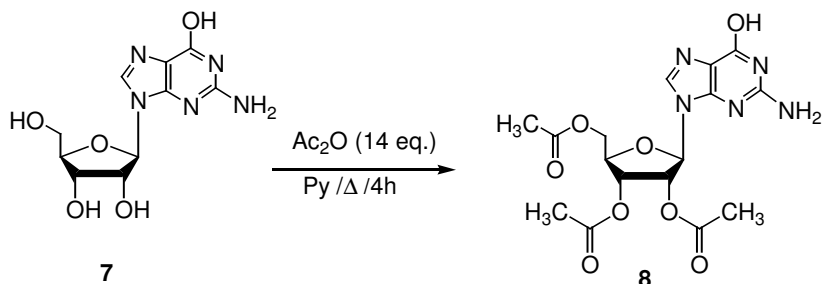


Foram adicionados a um balão 0,5 mL (3,23 mmol) de Et₃N, 4,5 mL de MeOH e 1,8 mL de H₂O e a esta solução, sob agitação, foram adicionados 0,180 g (0,44 mmol) de 2',3',5'-O-triacetiltioinosina **6**, ficando sob agitação à temperatura ambiente por 6 h. A mistura resultante foi evaporada em rotaevaporador e o resíduo obtido foi coevaporado por duas vezes com EtOH. O sólido foi recristalizado em MeOH, obtendo-se 0,12 g de tioinosina **1** (sólido

branco): Rend. 95%. P.f. = 213-215 °C (P.f.³¹ = 208-210 °C, P.f.³⁷ = 221-223 °C).
 IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 3377 (OH), 2654 (SH), 1601 (C=N), 1062 (C-O álcool).

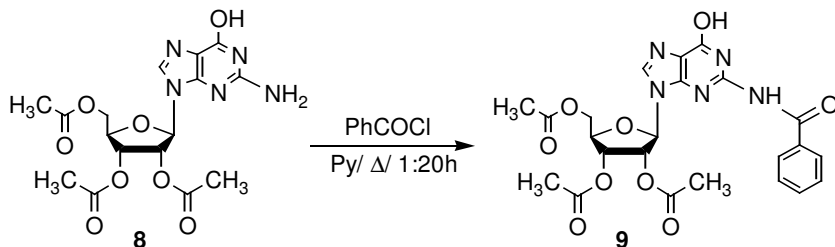
5.2.2 PREPARAÇÃO DE DERIVADOS DE GUANOSINA 7

5.2.2.1 Preparação da 2',3',5'-O-triacetilguanossina 8



A uma solução formada por 3,00 g (10,6 mmol) de guanossina **7** e 14 mL (149 mmol) de anidrido acético, protegida por um tubo secante de CaCl_2 , foram adicionados 7,0 mL (86,5 mmol) de piridina anidra. Esta solução foi deixada sob agitação magnética a 90 °C por 4 h. Após 48 h na geladeira o sólido formado foi filtrado a vácuo e lavado com água. O “gel” formado foi dissolvido em CH_2Cl_2 , em seguida o solvente foi evaporado no rotaevaporador e o óleo amarelo resultante foi coevaporado duas vezes com etanol e recristalizado com $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$, fornecendo 0,45 g de material, como sólido amarelado. Rend. 62%. P.f. = 63 °C (P.f.²⁹ = 232 °C). IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 3440 e 3150 (NH_2), 1745 (C=O éster), 1690 (CON), 1240 (OCO).

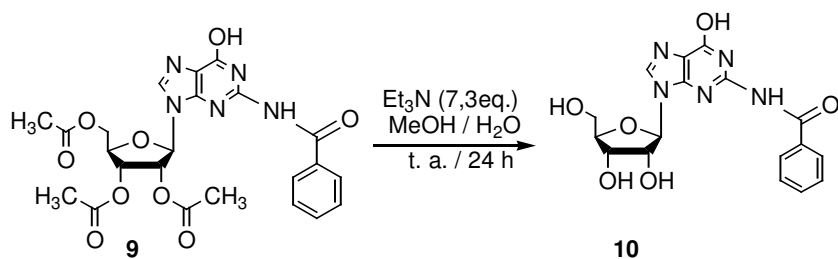
5.2.2.2 Preparação da 2',3',5'-O-triacetil-N²-benzoilguanossina 9



A um balão foram adicionados 0,470 g (1,15 mmol) de 2',3',5'-O-triacetilguanossina **8**, 3,20 mL (38,4 mmol) de piridina e 0,40 mL (3,44 mmol) de cloreto de benzoil, ficando sob agitação a 52 °C por 1:10 h. A mistura foi dissolvida em CH_2Cl_2 e tratada com HCl 1,0 M. A fase orgânica foi separada e

lavada com NaHCO_3 10% e água, seca com Na_2SO_4 , o solvente foi evaporado no rotaevaporador e o óleo amarelo resultante coevaporado duas vezes com EtOH. O óleo foi purificado por coluna cromatográfica empacotada com sílica gel (eluente: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 20:1), obtendo-se a 2',3',5'-triacetil- N^2 -benzoilguanosina **9** como um sólido laranja. Rend. 56%. P.f. = 124-125 °C. IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 3450 e 3190 (NH_2), 1750 ($\text{C}=\text{O}$ éster), 1700 ($\text{C}=\text{O}$ anel purínico e amida).

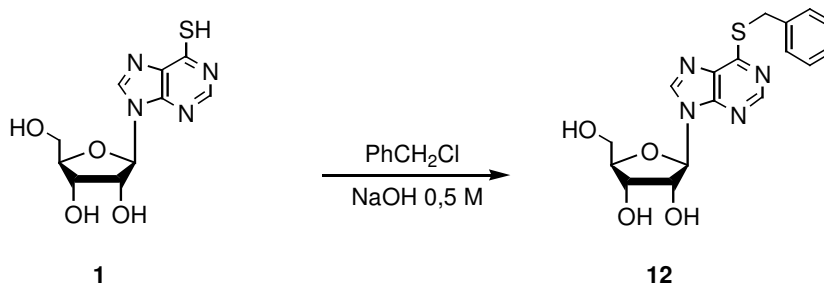
5.2.2.3 Preparação da N^2 -benzoilguanosina **10**



Em um balão colocou-se 0,060 g (0,117 mmol) de 2',3',5'-triacetil- N^2 -benzoilguanosina **9**, 1,20 mL (29,4 mmol) de MeOH, 0,48 mL de água e 0,25 mL (0,86 mmol) de Et_3N . A solução ficou sob agitação à temperatura ambiente por 24 h e em seguida o solvente foi levado ao rotaevaporador e o sólido amarelo resultante coevaporado 2 vezes com MeOH. Rend. 93%. P.f. = 214-221 °C (P.f.⁴⁰ = 240 -241 °C). IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 3465 (OH) 1695 ($\text{C}=\text{O}$ anel purínico e amida), 1604 ($\text{C}=\text{N}$),

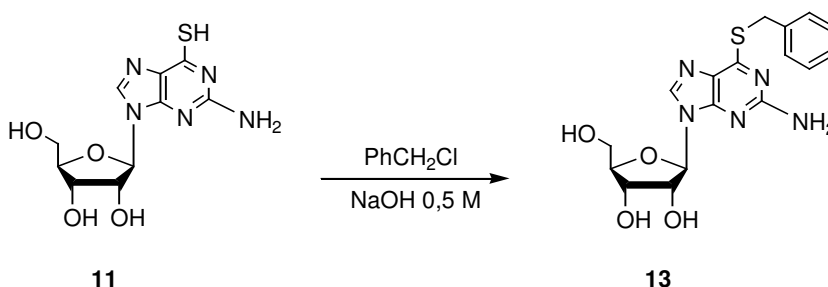
5.2.3 PREPARAÇÃO DE TIONUCLEOSÍDEOS S⁶-BENZILADOS 12, 13 E 14

5.2.3.1 Preparação de S⁶-benziltioinosina 12



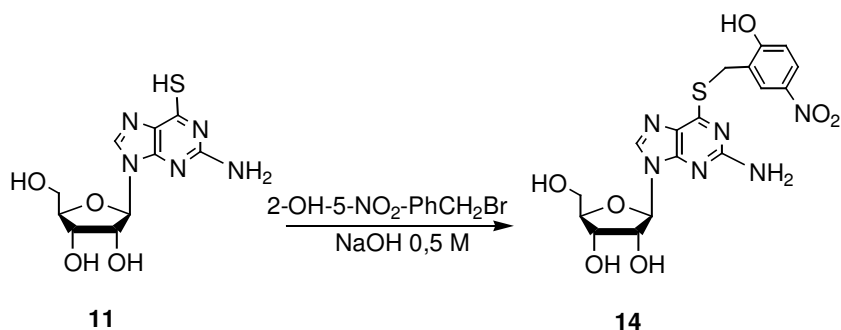
Em um balão foram colocados 0,50 mL de NaOH 0,5 M e 0,034 g (0,120 mmol) de tioinosina **1** e após aproximadamente 3 minutos foram adicionados 0,02 mL (0,14 mmol) de cloreto de benzil, ficando sob agitação à temperatura ambiente por 2 h. O sólido amarelo formado foi filtrado a vácuo, lavado com água e recristalizado com acetona, obtendo-se 0,02 g de um sólido amarelo com P.f. = 82-84 °C (P.f.⁴⁴ = 156-158 °C). IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 3420 (OH), 1573 (C=N), 1210 e 1108 (C–O).

5.2.3.2 Preparação de S⁶-benziltioguanosina 13



Em um balão foram colocados 1,30 mL de NaOH 0,5 M e 0,100 g (0,33 mmol) de tioguanosina **11** (Aldrich) e após aproximadamente 3 minutos foram adicionados 0,05 mL (0,40 mmol) de cloreto de benzil, ficando sob agitação à temperatura ambiente por 2 h. O sólido formado foi filtrado a vácuo, lavado com água e recristalizado com acetona, obtendo-se 0,07 g de S²-benziltioguanosina **13** como sólido branco. Rend. 54%. P.f. = 101-103 °C (P.f.⁴³ = 80-85 °C, P.f.⁴² = 101-103 °C). IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 3379 (OH), 1594 (C=N).

5.2.3.3 Preparação de *S*⁶-(2-hidroxi-5-nitrobenzil)tioguanosina **14**



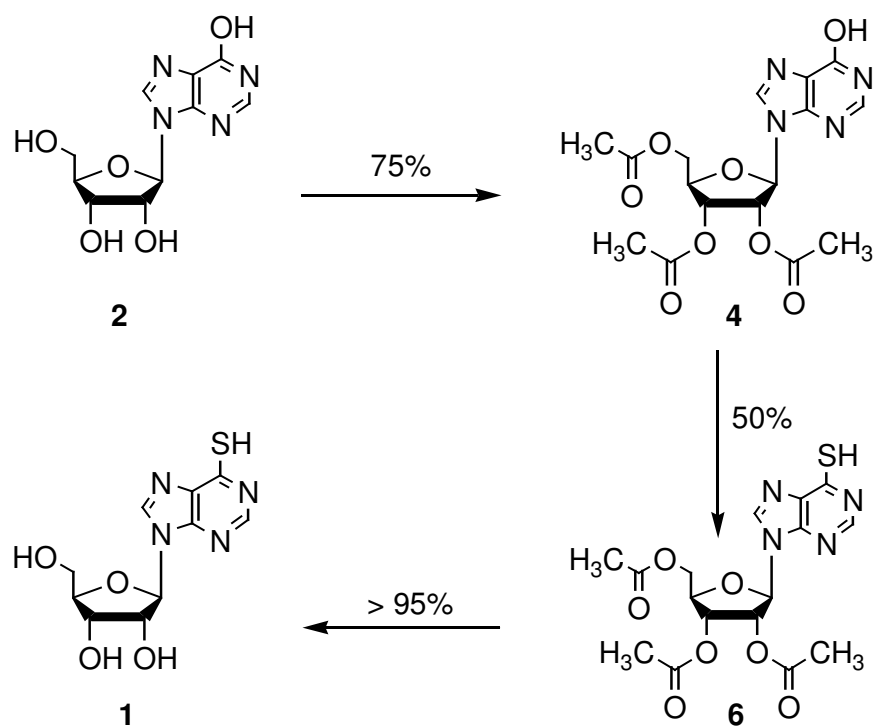
A uma solução contendo 0,80 mL de NaOH 0,5 M e 0,050 g (0,167 mmol) de tioguanosina **11** foram adicionados 0,047 g (0,201 mmol) de brometo de 2-hidroxi-5-nitrobenzil, formando uma suspensão amarela que ficou sob agitação à temperatura ambiente por aproximadamente 2 h. Em seguida, o sólido formado foi filtrado a vácuo, ao filtrado (óleo amarelo) foi adicionado água e fez-se 3 extrações com acetato de etila, a fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e o solvente evaporado no rotaevaporador resultando 0,03 g de um sólido amarelo. Rend. 37%. P.f. = 134-158 °C (P.f.⁴⁵ = 184 °C). IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 3398 (OH), 1594 (C=N), 1517 e 1340 (NO₂).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme Esquema 10, a preparação da tioinosina **1** a partir de inosina **2** foi efetuada em 3 etapas e diferentes condições reacionais (seção 4.1). O método que mais se destacou para a proteção da inosina foi aquele onde utilizou-se anidrido acético como agente acilante (seção 4.1.1.2), por envolver reagentes baratos e de fácil acesso, além de apresentar um rendimento mais alto (75%) que acilação da inosina com 4-ClPhCOCl (59%) .

Na etapa de tionação (seção 4.1.2), efetuou-se reações com reagentes anidros e não-anidros. Reações usando reagentes não-anidros acarretaram rendimentos mais baixos e produtos com significativo grau de impurezas, o que não é verificado nos produtos de reações utilizando-se condições anidras.

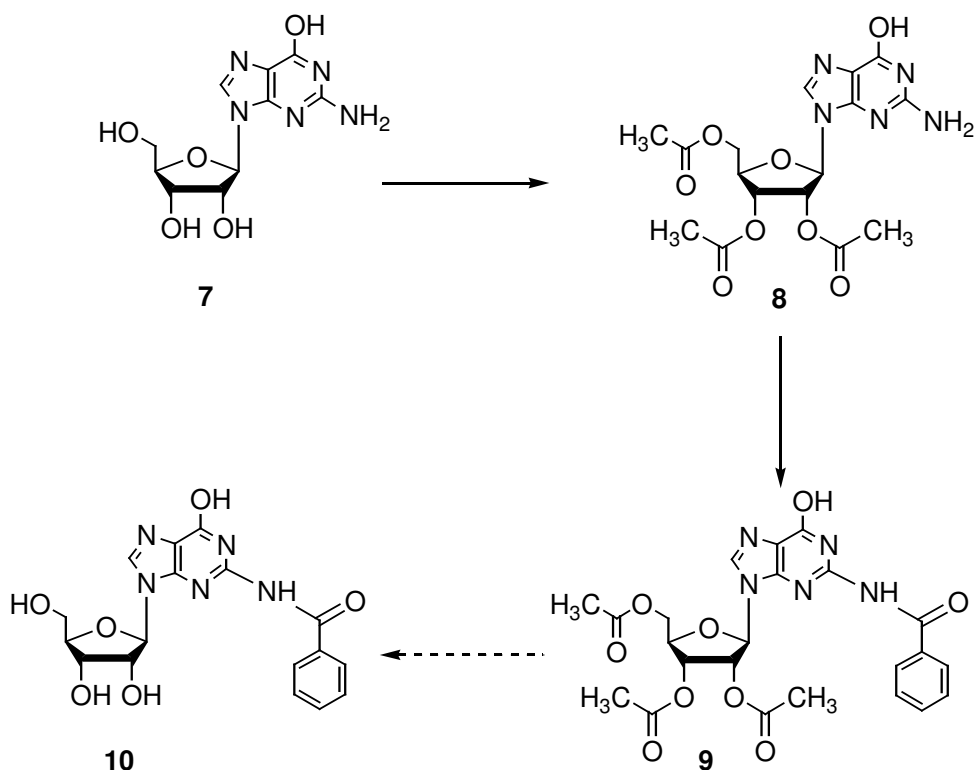
Para clivagem dos grupos protetores empregou-se diferentes condições reacionais variando-se as proporções entre os reagentes e o tempo de reação (seção 4.1.3.1). Nesta etapa foi verificado que os resultados foram similares em todas as condições reacionais estudadas, demonstrando a versatilidade da reação e apresentado ótimo rendimento (>95%).



Esquema 10 – Rota proposta para a preparação da tioinosina **1**.

A preparação da tioinosina **1** emprega uma metodologia simples e barata, apresentando um rendimento global de aproximadamente 45%, após otimização das reações (Esquema 10).

Com estes resultados pode-se efetuar reações em larga escala partindo-se da inosina **2** para se chegar a tioinosina **1**, que servirá como precursor de outros derivados em uma única etapa, diminuindo os gastos com reagentes e os tempos de reação. Como exemplo da utilização de tionucleosídeos como precursores sintéticos, foi estudada (seção 4.3) a síntese de derivados *S*⁶-benzilados **12**, **13** e **14** (esquema 9). Finalmente, empregando metodologias semelhantes às empregadas na síntese da tioinosina **1**, desenvolveu-se uma rota sintética simples para a preparação de *N*⁶-benzoilguanosina **10** (Esquema 11) a partir da guanosina **7**, ainda em fase de otimização.



Esquema 11 – Rota proposta para síntese de *N*⁶-benzoilguanosina **10**

Todos os derivados sintéticos apresentados neste trabalho foram submetidos aos testes de inibição enzimática frente à enzima GAPDH²⁰ e os resultados serão divulgados futuramente.

Procurou-se, desta forma, contribuir com o desenvolvimento de novos protótipos de fármacos para a doença de Chagas.

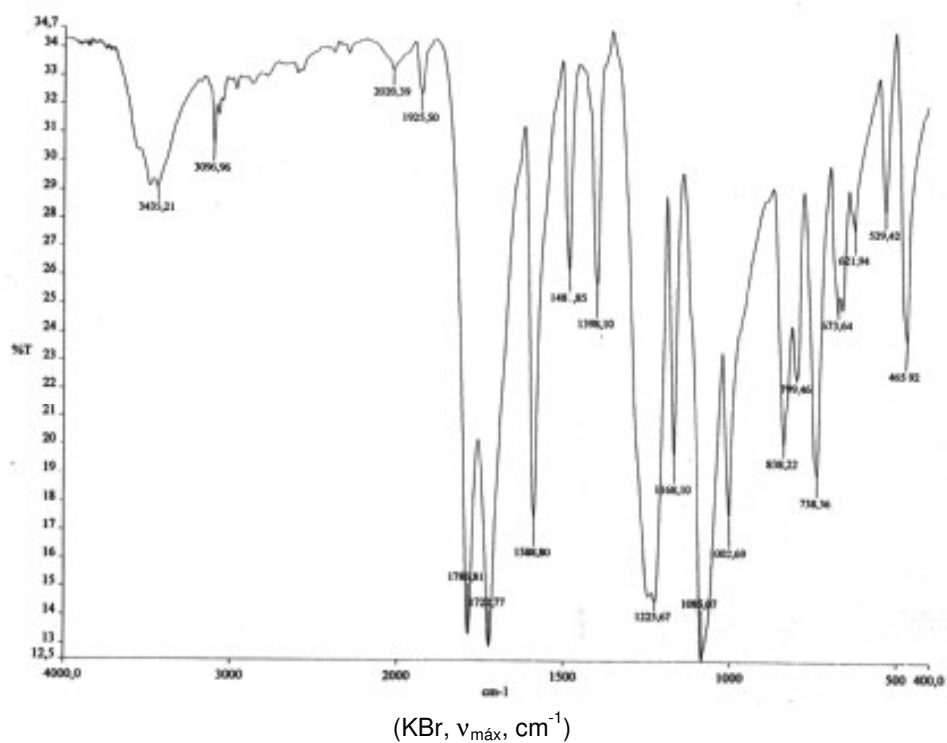
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Coura, J. R.; Castro, S. L. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2002**, 97, 3-24.
- (2) Tanowitz, H. B.; Kirchhoff, L. V.; Simon, D.; Morris, S. A.; Weiss, L. W.; Wittner, M. *Clin. Microb. Rev.* **1992**, 5, 400-419.
- (3) Verlinde, C. L. M. J.; Bressi, J. C.; Choe, J.; Suresh, S.; Voorhis, W. C. V.; Buckner, F. S.; Michels, P. A. M.; Gelb, M. H.; Hol, W. G. J. *Braz. Chem. Soc.* **2002**, 6, 843-848.
- (4) Verlinde, C. L. M. J.; Merrit, E. A.; Van Den Akker, F.; Kim, H.; Feil, I.; Delboni, L. F.; Mande, S. C.; Sarfaty, S.; Petra, P. H.; Hol, W. G. J. *Protein Science* **1994**, 3, 1670-1686.
- (5) Weekly Epidemiological Record, Geneva, **2000**; p 10-12.
- (6) <http://www.who.int/ctd/chagas/disease.htm> visitado em 02/2003.
- (7) Barreiro, E. J. *Química Nova* **2002**, 6B, 1172-1180.
- (8) Silverman, R. B. *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, Academic Press; Washington, **1992**.
- (9) Souza, D. H. F.; Garrat, R. C.; Araújo, A. P. U.; Guimarães, B. G.; Jesus, W. D. P.; Michels, P. A. M.; Hannaert, V.; Oliva, G. *FEBS Letters* **1998**, 424, 131-135.
- (10) Aronov, A. M.; Suresh, S.; Buckner, F. S.; Voorhis, W. C. V.; Verlinde, C. L. M. J.; Opperdoes, F. R.; Hol, W. G. J.; Gelb, M. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 4273-4278.
- (11) Aronov, A. M.; Verlinde, C. L. M. J.; Hol, W. G. J.; Gelb, M. H. *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 4790-4799.
- (12) Van Calenbergh, S.; Verlinde, C. L. M. J.; Soenens, J.; de Bruyn, A.; Callens, M.; Blaton, N. M.; Peeters, O. M.; Rozenski, J.; Hol, W. G. J.; Herdewijn, P. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 3838-3849.
- (13) Verlinde, C. L. M. J.; Callens, M.; Van Calenbergh, S.; Van Aerschot, A.; Herdewijn, P.; Hannaert, V.; Michels, P. A. M.; Opperdoes, F. R.; Hol, W. G. J. *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 3605-3613.
- (14) Kennedy, K. J.; Bressi, J. C.; Gelb, M. H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 95-98.
- (15) Bressi, J. C.; Verlinde, C. L. M. J.; Aronov, A. M.; Shaw, M. L.; Shin, S. S.; Nguyen, L. N.; Suresh, S.; Buckner, F. S.; Van Voorhis, W. C.; Kuntz, I. W.; Hol, W. G. J.; Gelb, M. H. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 2080-2093.
- (16) Leitão, A.; Andricopulo, A. D.; Oliva, G.; Pupo, M. T.; de Marchi, A. A.; Vieira, P. C.; Silva, M. F. G. F.; Ferreira, V. F.; Souza, M. C. B. V.; Sá, M. M.; Morais, V. R. S.; Montanari, C. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 2199-2204.
- (17) Pavão, F.; Castilho, M. S.; Pupo, M. T.; Dias, R. L. A.; Correa, A. G.; Fernandes, J. B.; da Silva, M. F. G. F.; Mafezoli, J.; Vieira, P. C.; Oliva, G. *FEBS Lett.* **2002**, 520, 13-17.
- (18) Sá, M. M.; Silveira, G. P.; Castilho, M. S.; Pavão, F.; Oliva, G. *Arkivoc* **2002**, 8, 112-124.
- (19) Vieira, P. C.; Mafezoli, J.; Pupo, M. T.; Fernandes, J. B.; Silva, M. F. G. F.; Albuquerque, S.; Oliva, G.; Pavão, F. *Pure Appl. Chem.* **2001**, 73, 617-622.
- (20) A obtenção da enzima gGAPDH em quantidades suficientes para os testes de inibição é realizada a partir da sua expressão recombinante em uma cepa de *Escherichia coli*. Esse plasmídeo foi desenvolvido no Instituto Internacional de Patologia Molecular e Celular da Bélgica e gentilmente cedido ao Laboratório de Cristalografia de Proteínas da Universidade de São Paulo em São Carlos (IFSC-USP), o qual tem realizado o processo de

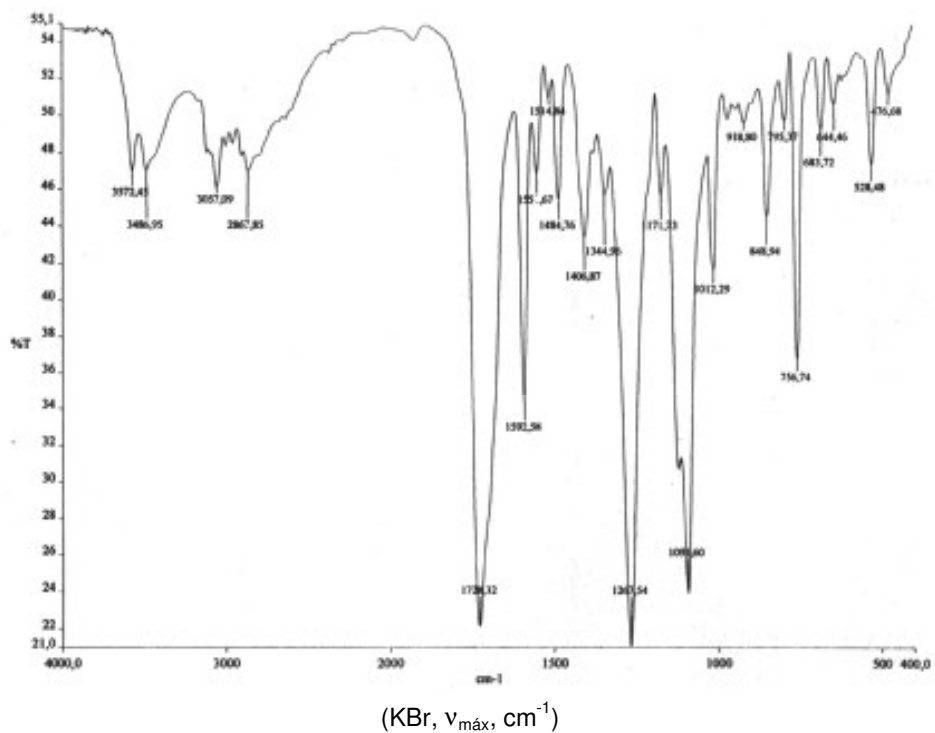
expressão da enzima de forma rotineira, com algumas modificações experimentais visando maior rendimento e pureza.

- (21) <http://hivmedicine.aidsportugal.com>, acessado em 06/04/2004
- (22) a - Solomons, T. W. G.; Fryhle, C. B. *Química Orgânica* 7ª ed.; LTC: Rio de Janeiro, **2002**, vol 2, 444.
b - Solomons, T. W. G.; Fryhle, C. B. *Química Orgânica* 7ª ed.; LTC: Rio de Janeiro, **2002**, vol 2, 101-103.
- (23) Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Princípios de Bioquímica* 2ª ed; SARVIER: São Paulo, **1995**, 242-245.
- (24) Hanna, B. N.; Bhahacharya, B. K.; Robins, R. K.; Avery, T. L.; Revankar, G. R. *J. Med. Chem.* **1994**, 37,177-183.
- (25) Hocek, M.; Holý, A.; Votruba, I.; Dvoráková, H. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 1817-1825.
- (26) Greene, T. W.; Wuts, P. G. M. *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, 2nd ed., New York, **1991**.
- (27) Lewis, L. R.; Robins, R.; Cheng, C. C. *J. Med. Chem.* **1964**, 7, 200-204.
- (28) Fox, J. J.; Wempen, I.; Hampton, A.; Doerr, I. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 1669-1675.
- (29) Brederick, H. *Chem. Ber.* **1947**, 5, 401-405.
- (30) Vogel, A. I. *Textbook of Practical Organic Chemistry* 5th ed.; Longman Scientific & Technical: England **1989**, 1351.
- (31) Ikehara, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1960**, 8, 367-368.
- (32) Baldissera, R. A. *Planejamento de Novos Agentes Anti-Chagásicos: Síntese e Avaliação Biológica de Nucleosídeos como Inibidores da Enzima Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase Glicosomal (gGAPDH) de Trypanosoma cruzi*, Trabalho de Conclusão de Curso, UFSC, **2003**.
- (33) Ikehara, M.; Uno, H.; Ishikawa, F. *Chem. Pharm. Bull.* **1964**, 12, 267-271.
- (34) Morrison, R. T.; Boyd, R. N. *Química Orgânica* 8ª ed.: Fundação C. Gulbenkian: Lisboa, **1986**. 1006.
- (35) Tsuzuki, T.; Nakajima, Y.; Watanabe, T.; Yanagiya, M.; Matsumoto, T. *Tetrahedron Letters* **1978**, 11, 989-982.
- (36) Srivastava, R. M.; Oliveira, F. J. S.; Silva, L. P.; Filho, J. R. F.; Oliveira, S. P.; Lima, V. L. M. *Carbohydr. Res.* **2001**, 332, 335-340.
- (37) Catálogo Sigma-Aldrich Química Brasil Ltda: São Paulo, **2001-2002**.
- (38) Reese, C. B.; Saffhill, R. *J. C. S. Perkin I.* **1972**, 2937-2940.
- (39) Gregoire, R. J.; Neilson, T. *Can. J. Chem.* **1978**, 56, 487-490.
- (40) Chládek, S.; Smrt, J. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1964**, 29, 215-233.
- (41) Montgomery, J. A.; Johnston, T. P.; Gallagher, A.; Stringfellow, C. R.; Schabel, J. *J. Med. Pharm. Chem.* **1961**, 3, 265-288.
- (42) Noell, C. W.; Robins, R. K. *J. Med. Pharm. Chem.* **1962**, 5, 1074-1085.
- (43) Naito, T.; Ueno, K.; Ishikawa, F. *Chem. Pharm. Bull.* **1964**, 12, 951-954.
- (44) Johnson, J. A.; Thomas, J.; Schaeffer, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 699-702
- (45) Paul, B.; Chen, M. F.; Paterson, A. R. P. *J. Med. Chem.* **1975**, 18, 965-973.
- (46) Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F. *Purification of Laboratory Chemicals*; 3rd ed.; Pergamon Press: New York, **1998**.

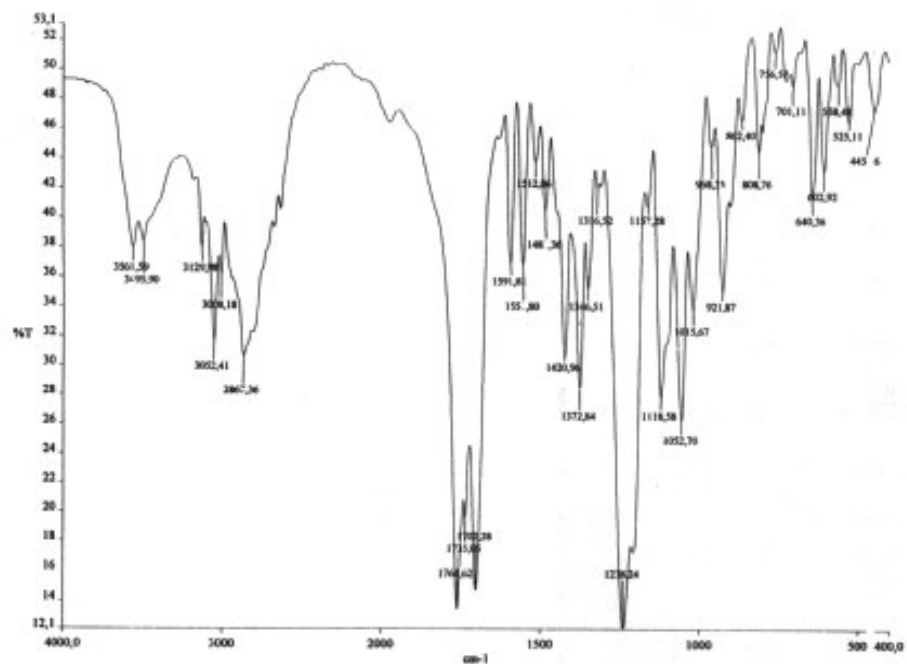
Anexos



Anexo 1: Espectro de IV do anidrido 4-Clorobenzóico.

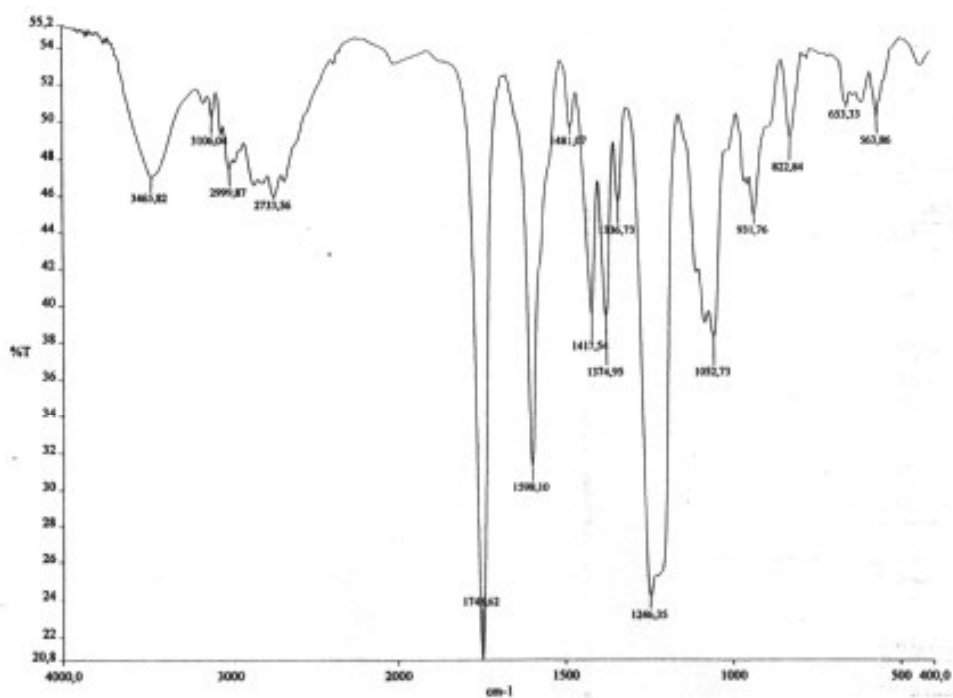


Anexo 2: Espectro de IV da 2',3',5'-O-tri-(4-clorobenzoil)inosina (**3**).



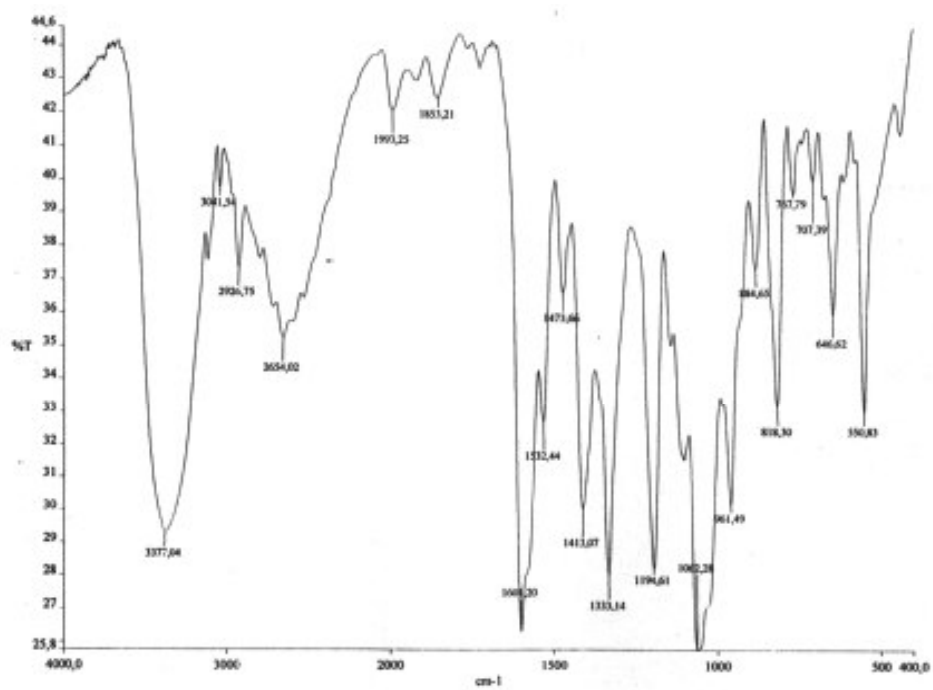
(KBr, $\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1})

Anexo 3: Espectro de IV da 2',3',5'-*O*-triacetilinosina (4).



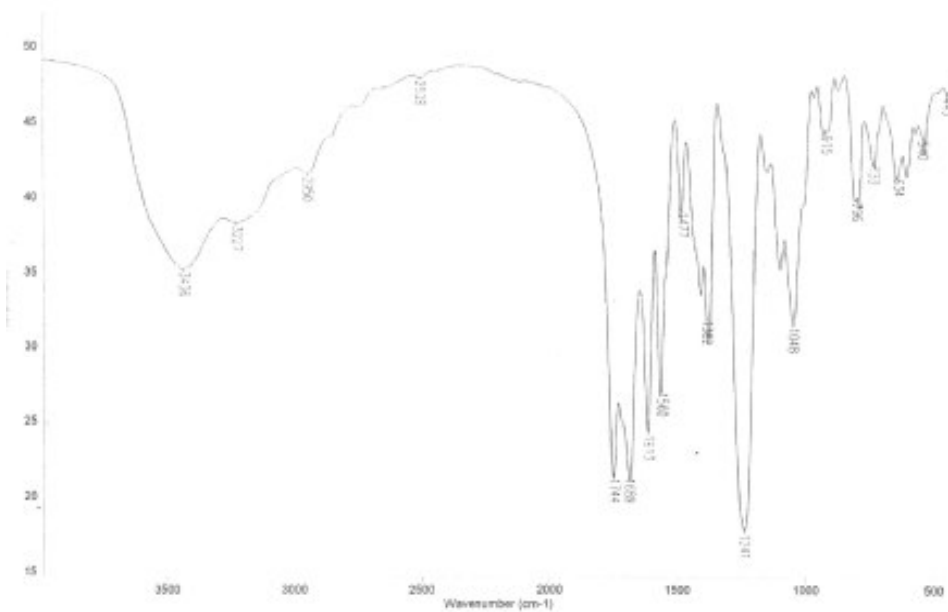
(KBr, $\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1})

Anexo 4: Espectro de IV da 2',3',5'-*O*-triacetilthiinosina (5).



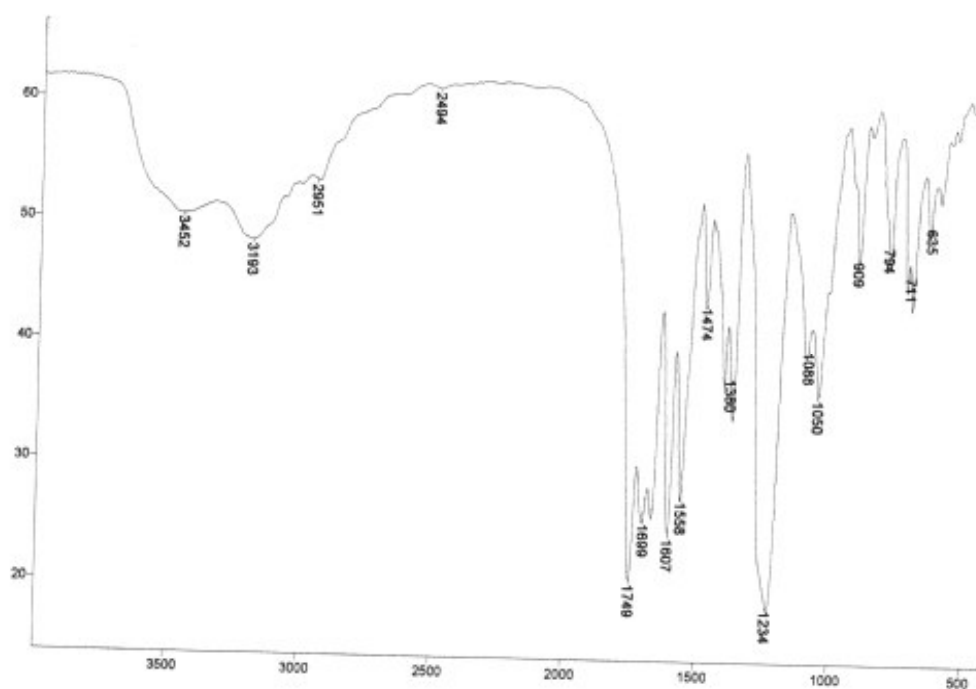
(KBr, $\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1})

Anexo 5: Espectro de IV da tioinosina (1).



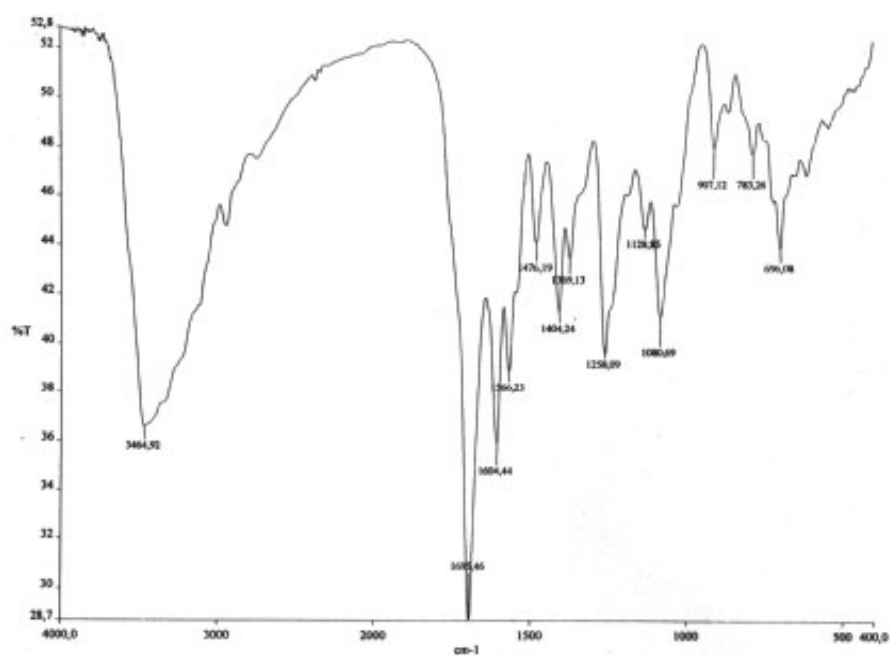
(KBr, $\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1})

Anexo 6: Espectro de IV da 2',3',5'-*O*-triacetilguanosina (8).



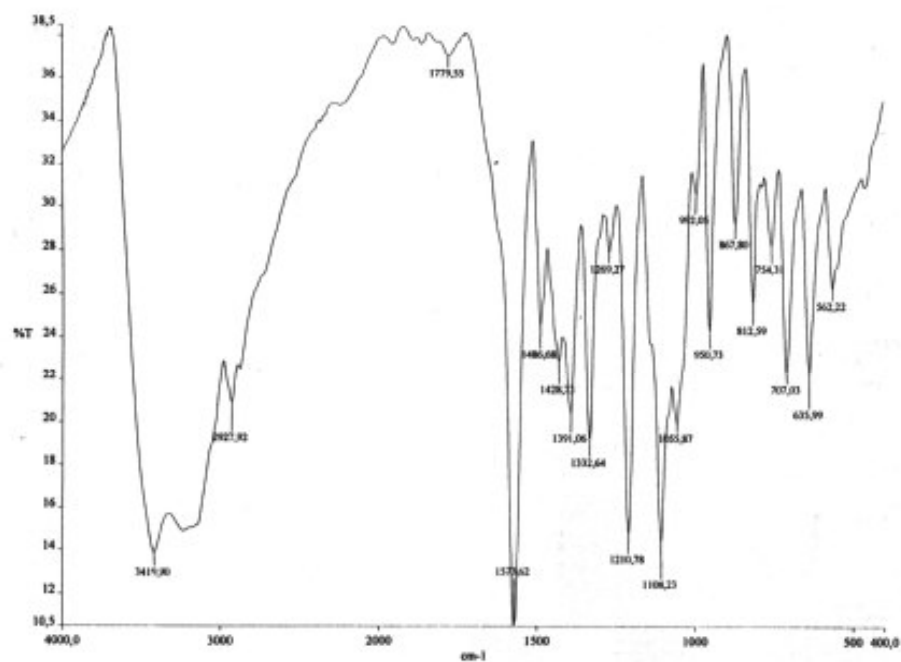
(KBr, $\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1})

Anexo 7: Espectro de IV da 2',3',5'-*O*-triacetil-*N*²-benzoilguanosina (**9**).



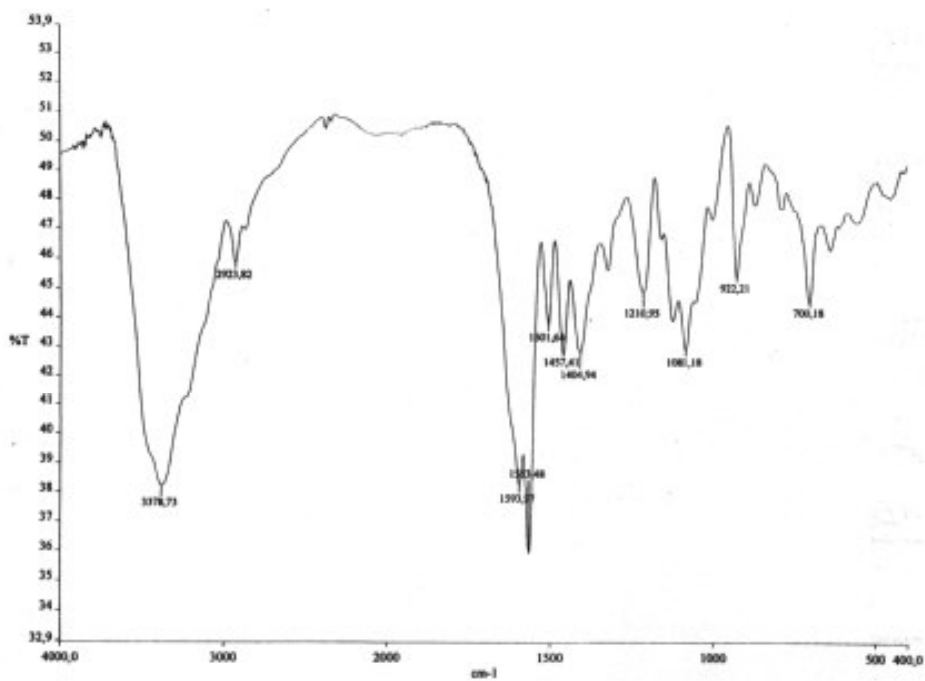
(KBr, $\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1})

Anexo 8: Espectro de IV da *N*²-benzoilguanosina (**10**).



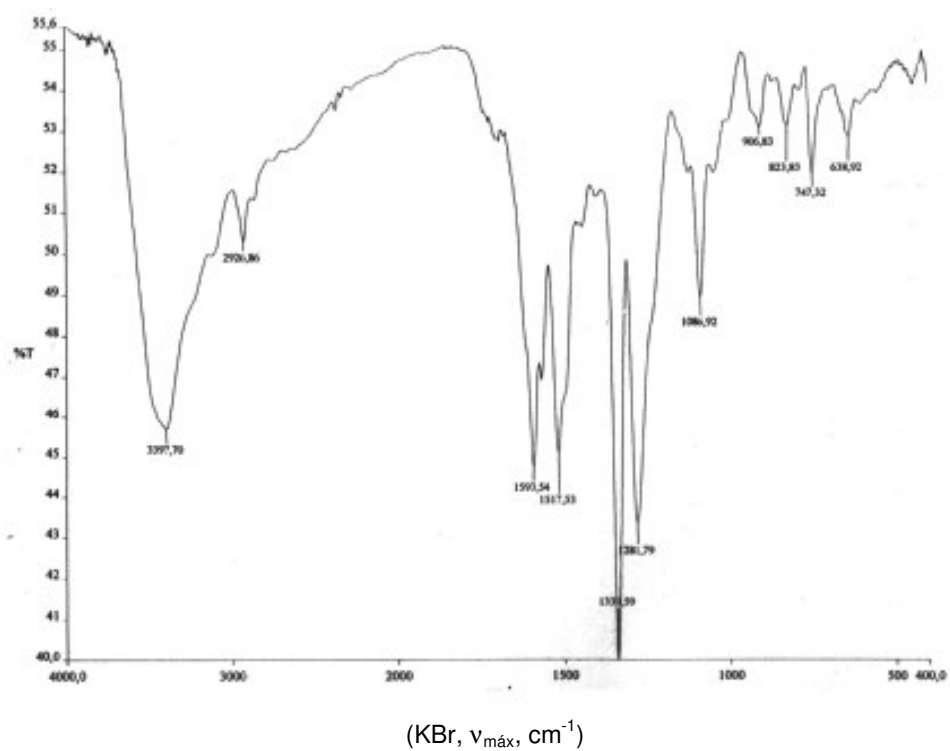
(KBr, $\nu_{\text{máx}}$, cm⁻¹)

Anexo 9: Espectro de IV da S⁶-benziltioinosina (**12**).



(KBr, $\nu_{\text{máx}}$, cm⁻¹)

Anexo 10: Espectro de IV da S⁶-benziltioguanosina (**13**).



Anexo 11: Espectro de IV da S^6 -(2-hidroxi-5-nitrobenzil)tioguanosina (**14**).